

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 11 月 29 日 (29.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/90338 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 9/24, 1/20, C12P 19/18, C12N 15/56, C07H 3/06, A61K 47/26, 7/50, 7/16, 7/48, C13K 13/00, A23L 1/09 // (C12N 9/24, C12R 1:06, 1:07)

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/04276

(22) 国際出願日: 2001 年 5 月 22 日 (22.05.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-149484 2000 年 5 月 22 日 (22.05.2000) JP  
特願2000-229557 2000 年 7 月 28 日 (28.07.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 林原生物化学研究所 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 Okayama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 久保田 倫夫 (KUBOTA, Michio) [JP/JP]. 西本友之 (NISHIMOTO, Tomoyuki) [JP/JP]. 阿賀 創 (AGA, Hajime) [JP/JP]. 福田 恵温 (FUKUDA, Shigeharu) [JP/JP]. 三宅 俊雄 (MIYAKE, Toshio) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社 林原生物化学研究所 内 Okayama (JP).

(81) 指定国 (国内): JP, KR, US.

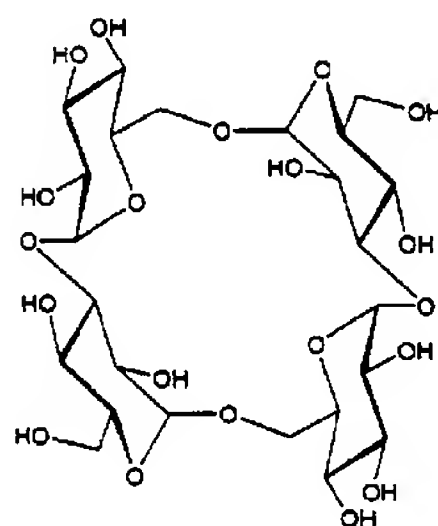
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title:  $\alpha$ -ISOMALTOSYLTRANSFERASE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND USE THEREOF

(54) 発明の名称:  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とその製造方法並びに用途



(57) Abstract:  $\alpha$ -Isomaltosyltransferase capable of forming a cyclic tetrasaccharide having a cyclo { - 6 } -  $\alpha$ -D-glucopyranosyl- (1 - 3) -  $\alpha$ -D-glucopyranosyl- (1 - 6) -  $\alpha$ -D-glucopyranosyl- (1 - 3) -  $\alpha$ -D-glucopyranosyl- (1 - ) structure via a reaction involving  $\alpha$ -isomaltosyl transfer starting from a saccharide having an  $\alpha$ -1,6-glucosyl bond as the bonding manner at the non-reducing end and an  $\alpha$ -1,4-glucosyl bond as the bonding manner at the part other than the reducing end and having a degree of glucose polymerization of at least 3 is provided. Also, a microorganism producing the above enzyme, a process for producing the above enzyme, the cyclic tetrasaccharide obtained by using the above enzyme or a carbohydrate containing the same, and use thereof are established.

[続葉有]



WO 01/90338 A1



---

(57) 要約:

本発明は、非還元末端の結合様式として $\alpha-1,6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1,4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から、 $\alpha$ -イソマルトシル転移を含む反応によって、サイクロ $\{\rightarrow 6\}-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1\rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1\rightarrow 6)-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1\rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシル $-(1\rightarrow)$ の構造を有する環状四糖を生成する $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を提供すると共に、当該酵素を産生する微生物、当該酵素の製造方法、当該酵素を用いて得られる環状四糖又はこれを含む糖質、及びそれらの用途を確立したものである。

## 明 細 書

 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とその製造方法並びに用途

## 5 技術分野

本発明は、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素とその製造方法並びに用途に関し、より詳細には、新規 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素、当該酵素を産生する微生物、当該酵素の製造方法、当該酵素を用いる $\alpha$ -イソマルトシル転移反応方法、当該酵素を用いて得られるサイクロ { $\rightarrow 6$ }- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ )の構造を有する環状四糖、又はこれを含む糖質及びそれらの製造方法、更には、サイクロ { $\rightarrow 6$ }- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ )の構造を有する環状四糖、又はこれを含む糖質、及びその糖質を含有せしめた組成物に関する。

## 背景技術

20 グルコースを構成糖とする糖質としては、例えば、澱粉の部分分解物であるアミロース、アミロデキストリン、マルトデキストリン、マルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖などが知られている。これらの糖質は、通常、分子の両端にそれぞれ非還元末端と還元末端とを有し、還元性を示すことが知られている。一般に、澱粉部分分解物は、固形物当たりの  
25 還元力の大きいものは、通常、分子が小さく低粘度で甘味が強いものの、他の化合物との反応性が高く、例えば、アミノ酸や蛋白質などのアミノ

基を持つ物質とアミノカルボニル反応を起し易く、褐変や悪臭を生じ、その品質劣化を起こし易い欠点のあることが知られている。斯かる欠点を改善するために、澱粉部分分解物の構成糖であるグルコースを変えることなく、その還元力を低減、若しくは消滅させる方法が古くから望まれていた。例えば、『ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー (Journal of American Chemical Society)』、第71巻、353乃至358頁(1949年)で開示されているように、澱粉にマセランス・アミラーゼ (macerans amylase) を作用させることにより、6乃至8分子のグルコースが $\alpha$ -1, 4グルコシル結合した $\alpha$ -、 $\beta$ -又は $\gamma$ -環状デキストリンを生成させる方法が知られている。昨今、澱粉からこれら環状デキストリンが工業的規模で生産され、これら環状デキストリンは、それらが有する非還元性、無味性、包接能などの特性を生かした用途に利用されている。また、先に本出願人が、特開平7-143876号公報、特開平7-213283号公報などで開示したように、マルトオリゴ糖など澱粉部分分解物に非還元性糖質生成酵素及びトレハロース遊離酵素を作用させることにより、2分子のグルコースが $\alpha$ 、 $\alpha$ -結合したトレハロースを生成させる方法が知られている。現在では、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースは、澱粉から工業的規模で生産され、その非還元性、温和で高品質な甘味特性などを生かした用途に利用されている。このように、グルコースを構成糖とする非還元性糖質として、グルコース重合度が2の $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース、グルコース重合度が6乃至8の $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -環状デキストリンは、それぞれの特性を生かして工業的規模で生産され、利用されているものの、その種類が限られており、更に多様な非還元性糖質乃至低還元性糖質の提供が望まれている。

一方、近年、グルコースを構成糖とする新たな環状の四糖類が報告さ



れた。即ち、『ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー  
(European Journal of Biochemistry)  
y)』、第226巻、641乃至648頁(1994年)には、主としてグルコース残基が $\alpha-1, 3$ 結合と $\alpha-1, 6$ 結合で交互に連なっ  
5 ている、アルテルナン(alternan)に加水分解酵素アルテルナナーゼ(alternanase)を作用させることにより、サイクロ{ $\rightarrow 6$ }- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-( $1 \rightarrow 3$ )- $\alpha$ -D-グルコピラノ  
シル-( $1 \rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-( $1 \rightarrow 3$ )- $\alpha$ -D-  
グルコピラノシル-( $1 \rightarrow$ )の構造を有する環状四糖(本明細書におい  
10 ては、本糖質を「環状四糖」と略称することもある。)が生成し、これ  
を有機溶媒の一種であるメタノール共存下で晶出させることが示されて  
いる。

環状四糖は、環状構造を有することから、各種化合物を包接する能力  
を有すると共に、非還元性故に、アミノカルボニル反応を起こさず、褐  
15 変、劣化を懸念することなく各種用途に加工、利用できることが期待さ  
れる。しかしながら、環状四糖の製造原料としてのアルテルナンや、環  
状四糖の製造に必要な酵素であるアルテルナナーゼの入手が困難である  
上、それらを産生する微生物も容易に入手できる状態にはない。

斯かる状況下、斯界に於いては、環状四糖を工業的規模で容易に実施  
20 できる新たな製造方法の確立と、理化学的性質の解明された環状四糖の  
提供が鶴首される。

#### 発明の開示

本発明の目的は、入手容易な糖質から環状四糖を生成する新規酵素、  
25 当該酵素の製造方法、当該酵素を用いる $\alpha$ -イソマルトシル転移反応方  
法、当該酵素を用いて得られる環状四糖、又はこれを含む糖質及びその

製造方法、及び、環状四糖、又はこれを含む糖質を含有せしめた組成物を提供することにある。

本発明者等は、上記課題を解決するために、イソマルトオリゴ糖に着目し、その内、パノースから環状四糖を生成する新規な酵素を得ることを目的として、広く微生物を検索してきた。その結果、岡山県岡山市の土壌から単離したバチルス（*Bacillus*）属に属する新規微生物（「C9株」、「C11株」及び「N75株」）並びに長野県下高井郡の土壌及び岡山県岡山市の土壌からそれぞれ単離したアルスロバクター（*Artrobacter*）属に属する新規微生物（「S1株」及び「A19株」）が、前記酵素の産生能を有することを見出した。

本発明者等は、前記微生物C9株、C11株、N75株、S1株、及びA19株のいずれの株も、新規酵素、即ち、新規な $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を生産し、この新規酵素は、パノースやイソマルトシルマルトースなどの非還元末端の結合様式として $\alpha$ -1, 6グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha$ -1, 4グルコシル結合を有しているグルコース重合度が3以上の糖質（本明細書においては、本糖質を「 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質」と略称することもある。）に作用して環状四糖を生成することを見出した。また、本発明者等は、当該酵素の諸性質を明らかにすると共に、その製造方法を確認し、また、当該酵素による転移反応方法、及び当該酵素を用いた環状四糖、又はこれを含む糖質の製造方法を確認した。更に、本発明者等は、この環状四糖の理化学的性質を調べたところ、環状四糖の形態として、5乃至6含水結晶、1含水結晶、無水結晶などの結晶及び非晶質の形態のものが存在すること、また、メチルアルコールやエチルアルコールなどの有機溶媒を用いることなく、環状四糖の過飽和水溶液から前記結晶を容易に晶出し、採取できることを見出した。更に、このようにして得られる環

状四糖は、例えば、エチルアルコールや酢酸などの揮発成分を包接する能力を有すること、また、アミノカルボニル反応を起こさず、自体、褐変や劣化が比較的少ないこと、熱やpHに安定であること、更には、食品本来の風味を損なうことのない温和で低甘味の糖質であること、難発酵性、難消化性で食物繊維として好適であるなどの種々の有用な特性を有していることを見出した。また、環状四糖、又はこれを含む糖質を含有せしめた組成物、例えば、風味良好な高品質の食品、低カロリー食品、ダイエット食品、安定で高品質な化粧品、更に、高活性で安定な医薬品とそれらの製造方法を確立して本発明を完成した。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素反応により得られた糖質を高速液体クロマトグラフィーにかけたときの溶出パターンを示す図である。

第2図は、本発明の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素反応により得られた環状四糖の核磁気共鳴スペクトル( $^1\text{H}$ -NMRスペクトル)を示す図である。

第3図は、本発明の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素反応により得られた環状四糖の核磁気共鳴スペクトル( $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル)を示す図である。

第4図は、環状四糖の構造が、サイクロ{ $-(6)-\alpha$ -D-グルコピラノシル $-(1,3)-\alpha$ -D-グルコピラノシル $-(1,6)-\alpha$ -D-グルコピラノシル $-(1,3)-\alpha$ -D-グルコピラノシル $-(1-)$ }であることを示す図である。

第5図は、本発明のバチルス・グロビスポルスC9由来の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

第 6 図は、本発明のバチルス・グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

第 7 図は、本発明のバチルス・グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の温度安定性を示す図である。

5 第 8 図は、本発明のバチルス・グロビスポルス C 9 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の pH 安定性を示す図である。

第 9 図は、本発明のバチルス・グロビスポルス C 1 1 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

10 第 1 0 図は、本発明のバチルス・グロビスポルス C 1 1 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

第 1 1 図は、本発明のバチルス・グロビスポルス C 1 1 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の温度安定性を示す図である。

第 1 2 図は、本発明のバチルス・グロビスポルス C 1 1 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の pH 安定性を示す図である。

15 第 1 3 図は、本発明のバチルス・グロビスポルス N 7 5 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

第 1 4 図は、本発明のバチルス・グロビスポルス N 7 5 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

20 第 1 5 図は、本発明のバチルス・グロビスポルス N 7 5 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の温度安定性を示す図である。

第 1 6 図は、本発明のバチルス・グロビスポルス N 7 5 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の pH 安定性を示す図である。

第 1 7 図は、本発明のアルスロバクター・ラモサス S 1 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

25 第 1 8 図は、本発明のアルスロバクター・ラモサス S 1 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

第 19 図は、本発明のアルスロバクター・ラモサス S 1 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の温度安定性を示す図である。

第 20 図は、本発明のアルスロバクター・ラモサス S 1 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の pH 安定性を示す図である。

5 第 21 図は、本発明のアルスロバクター・グロビホルミス A 19 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

第 22 図は、本発明のアルスロバクター・グロビホルミス A 19 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図  
10 である。

第 23 図は、本発明のアルスロバクター・グロビホルミス A 19 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の温度安定性を示す図である。

第 24 図は、本発明のアルスロバクター・グロビホルミス A 19 由来の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の pH 安定性を示す図である。

15 第 25 図は、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素反応により得られた環状四糖 5 乃至 6 含水結晶状粉末の顕微鏡写真をディスプレイ上に表示した中間調画像である。

第 26 図は、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素反応により得られた環状四糖 5 乃至 6 含水結晶状粉末を粉末 X 線回折法で解析したときの  
20 回折スペクトルを示す図である。

第 27 図は、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素反応により得られた環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末を熱重量測定したときの熱重量曲線を示す図である。

第 28 図は、本発明の環状四糖 1 含水結晶粉末を粉末 X 線回折法で解  
25 析したときの回折スペクトルを示す図である。

第 29 図は、本発明の環状四糖 1 含水結晶粉末を熱重量測定したとき

の熱重量曲線を示す図である。

第30図は、本発明の環状四糖5乃至6含水結晶粉末を40℃で真空乾燥して得た環状四糖無水結晶粉末を粉末X線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

5 第31図は、本発明の環状四糖5乃至6含水結晶粉末を120℃で真空乾燥して得た環状四糖無水結晶粉末を粉末X線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

第32図は、本発明の無水環状四糖粉末を熱重量測定したときの熱重量曲線を示す図である。

10

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明による微生物C9株、C11株及びN75株（以上バチルス属）ならびに微生物S1株及びA19株（以上アルスロバクター属）の同定試験結果を示す。なお、同定試験は、『微生物の分類と同定』

15 （長谷川武治編、学会出版センター、1985年）に準じて行った。

<微生物C9株>

A 細胞形態

（1） 肉汁寒天培養、27℃

20 通常0.5乃至1.0μm×1.5乃至5.0μmの桿菌。多形性なし。  
。運動性あり。球形の胞子を細胞内の端に形成。膨潤した胞子嚢を形成。  
。グラム陽性。

B 培養性質

（1） 肉汁寒天平板培養、27℃

形状： 円形、大きさは2日間で1乃至2mm

25 周縁： 全縁

隆起： 半レンズ状

光 沢： 鈍 光  
表 面： 平 滑  
色 調： 不 透 明、 淡 い 黄 色

- ( 2 ) 肉 汁 寒 天 斜 面 培 養、 2 7 ℃  
5 生 育： 中 程 度  
形 状： 放 散 状  
( 3 ) 肉 汁 ゼ ラ チ ン 穿 刺 培 養、 2 7 ℃  
液 化 す る。

C 生 理 学 的 性 質

- 10 ( 1 ) V P 試 験： 陰 性  
( 2 ) イ ン ド ー ル の 生 成： 陰 性  
( 3 ) 硝 酸 か ら の ガ ス 生 成： 陽 性  
( 4 ) 澱 粉 の 加 水 分 解： 陽 性  
( 5 ) 色 素 の 生 成： 可 溶 性 色 素 の 生 成 は な い  
15 ( 6 ) ウ レ ア ー ゼ： 陽 性  
( 7 ) オ キ シ ダ ー ゼ： 陽 性  
( 8 ) カ タ ラ ー ゼ： 陽 性  
( 9 ) 生 育 の 範 囲： p H 5 . 5 乃 至 9 . 0、 温 度 1 0 乃 至 3 5 ℃  
( 1 0 ) 酸 素 に 対 す る 態 度： 好 気 性

- 20 ( 1 1 ) 炭 素 源 の 利 用 性 と 酸 生 成 の 有 無

	利 用 性	酸 生 成
D - グ ル コ ー ス	利 用 す る	陽 性
グ リ セ ロ ー ル	利 用 す る	陽 性
ス ク ロ ー ス	利 用 す る	陽 性
25 ラ ク ト ー ス	利 用 す る	陽 性

- ( 1 . 2 ) D N A の G C 含 量： 4 0 %



以上の菌学的性質に基づいて、『バーギーズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)』、第2巻 (1986年) を参考にして、公知菌との異同を検討した。その結果、  
5 本菌は、バチルス・グロビスポルス (Bacillus globisporus) に属する新規微生物であり、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質から  $\alpha$ -イソマルトシル基を転移して環状四糖を生成する本発明の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を産生する文献未記載の特徴を有する微生物であることが判明した。

10 これらの結果より、本発明者等は、本菌をバチルス・グロビスポルス C9 と命名し、平成12年4月25日付で、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託し、受託番号 FERM BP-7143 として受託された。

15 <微生物 C11 株>

A 細胞形態

(1) 肉汁寒天培養、27℃

通常0.5乃至1.0  $\mu\text{m}$   $\times$  1.5乃至5  $\mu\text{m}$  の桿菌。多形性なし。運動性あり。球形の胞子を細胞内の端に形成。膨潤した胞子嚢を形成。

20 グラム陽性。

B 培養性質

(1) 肉汁寒天平板培養、27℃

形状： 円形、大きさは2日間で1乃至2 mm

周縁： 全縁

25 隆起： 半レンズ状

光沢： 鈍光

表面： 平滑

色調： 不透明、淡い黄色

( 2 ) 肉汁寒天斜面培養、 2 7 ℃

生育： 中程度

形状： 放散状

5 ( 3 ) 肉汁ゼラチン穿刺培養、 2 7 ℃

液化する。

C 生理学的性質

( 1 ) V P 試験： 陰性

( 2 ) インドールの生成： 陰性

10 ( 3 ) 硝酸からのガス生成： 陽性

( 4 ) 澱粉の加水分解： 陽性

( 5 ) 色素の生成： 可溶性色素の生成はない

( 6 ) ウレアーゼ： 陽性

( 7 ) オキシダーゼ： 陽性

15 ( 8 ) カタラーゼ： 陽性

( 9 ) 生育の範囲： p H 5 . 5 乃至 9 . 0 、 温度 1 0 乃至 3 5 ℃

( 1 0 ) 酸素に対する態度： 好気性

( 1 1 ) 炭素源の利用性と酸生成の有無

		利用性	酸生成
20	D - グルコース	利用する	陽性
	グリセロール	利用する	陽性
	スクロース	利用する	陽性
	ラクトース	利用する	陽性

( 1 2 ) D N A の G C 含量： 3 9 %

25 以上の菌学的性質に基づいて、『バーギーズ・マニュアル・オブ・シ  
ステマティック・バクテリオロジー ( B e r g e y ' s M a n u a l

of Systematic Bacteriology』、第2巻  
(1986年)を参考にして、公知菌との異同を検討した。その結果、  
本菌は、バチルス・グロビスポルス (Bacillus globis  
porus) に属する新規微生物であり、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖  
5 質から $\alpha$ -イソマルトシル基を転移して環状四糖を生成する本発明の $\alpha$ -  
イソマルトシル転移酵素を産生する文献未記載の特徴を有する微生物  
であることが判明した。

これらの結果に基づき、本発明者等は、本菌を新規微生物バチルス・  
グロビスポルス C11 と命名し、平成12年4月25日付で日本国茨城  
10 県つくば市東1丁目1番地1 中央第6所在の独立行政法人産業技術総  
合研究所 特許生物寄託センターに寄託し、受託番号FERM BP-  
7144として受託された。

<微生物 N75 株>

#### A 細胞形態

15 (1) 肉汁寒天培養、27℃

通常0.5乃至1.0  $\mu\text{m}$   $\times$  1.5乃至5  $\mu\text{m}$ の桿菌。多形性なし。  
運動性あり。球形の胞子を細胞内の端に形成。膨潤した胞子嚢を形成。  
グラム陽性。

#### B 培養性質

20 (1) 肉汁寒天平板培養、27℃

形状： 円形、大きさは2日間で1乃至2 mm

周縁： 全縁

隆起： 半レンズ状

光沢： 鈍光

25 表面： 平滑

色調： 不透明、淡い黄色

(2) 肉汁寒天斜面培養、27℃

生育： 中程度

形状： 放散状

(3) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27℃

液化する。

5 C 生理学的性質

(1) VP試験： 陰性

(2) インドールの生成： 陰性

(3) 硝酸からのガス生成： 陽性

(4) 澱粉の加水分解： 陽性

10 (5) 色素の生成： 可溶性色素の生成はない

(6) ウレアーゼ： 陽性

(7) オキシダーゼ： 陽性

(8) カタラーゼ： 陽性

(9) 生育の範囲： pH 5.7 乃至 9.0、温度 10 乃至 35℃

15 (10) 酸素に対する態度： 好気性

(11) 炭素源の利用性と酸生成の有無

	利用性	酸生成
D-グルコース	利用する	陽性
グリセロール	利用する	陽性
20 スクロース	利用する	陽性
ラクトース	利用する	陽性

(12) DNAのGC含量：40%

以上の菌学的性質に基づいて、『バーjeeズ・マニュアル・オブ・シ  
ステマティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual  
25 of Systematic Bacteriology』、第2巻  
(1986年)を参考にして、公知菌との異同を検討した。その結果、

本菌は、バチルス・グロビスポルス（*Bacillus globisporus*）に属する新規微生物であり、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質から $\alpha$ -イソマルトシル基を転移して環状四糖を生成する本発明の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を産生する文献未記載の特徴を有する微生物であることが判明した。

これらの結果より、本発明者等は、本菌をバチルス・グロビスポルス N 7 5 と命名し、平成 1 3 年 5 月 1 6 日付で日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 所在の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託し、受託番号 F E R M B P - 7 5 9 1 として受託された。

<微生物 S 1 株>

#### A 細胞形態

(1) 肉汁寒天培養、27℃

通常 0.3 乃至 0.7  $\mu$ m  $\times$  0.8 乃至 3.5  $\mu$ m の桿菌。多形性あり。運動性なし。無孢子。グラム陽性。

(2) E Y G 寒天培地、27℃

桿菌－球菌の生育サイクルを示す。

#### B 培養性質

(1) 肉汁寒天平板培養、27℃

形状：円形、大きさは 1 日間で 2 乃至 3 mm

周縁：全縁

隆起：半レンズ状

光沢：鈍光

表面：平滑

色調：不透明、淡い黄色

(2) 肉汁寒天斜面培養、27℃

生育：中程度

形状： 糸状

(3) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27℃

液化しない。

C 生理学的性質

5 (1) 澱粉の加水分解： 陰性

(2) 色素の生成： 可溶性の色素の生成はない

(3) ウレアーゼ： 陽性

(4) オキシダーゼ： 陽性

(5) カタラーゼ： 陽性

10 (6) 酸素に対する態度： 好気性

(7) 細胞壁の主要ジアミノ酸： リジン

(8) 細胞壁のペプチドグリカン型： リジン-アラニン

(9) 細胞壁のN-アシル型： アセチル

15 (10) 細胞壁の構成糖： ガラクトース、グルコース、ラムノース  
、マンノース

(11) ビタミンの要求性： なし

(12) DNAのGC含量： 65%

(13) DNA-DNAホモロジー： アルスロバクター・ラモサス  
(ATCC 13727)との間で84.4%のDNA-DNAホモロ  
20 ジーを示す

以上の菌学的性質に基づいて、『バーギーズ・マニュアル・オブ・シ  
ステマティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual  
of Systematic Bacteriology』、第2巻  
(1986年)を参考にして、公知菌との異同を検討した。その結果、  
25 本菌は、アルスロバクター・ラモサス (Bacillus ramos  
us) に属する新規微生物であり、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質から

$\alpha$ -イソマルトシル基を転移して環状四糖を生成する本発明の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を産生する文献未記載の特徴を有する微生物であることが判明した。

これらの結果より、本発明者等は、本菌をアルスロバクター・ラモサス S 1 と命名し、平成 13 年 5 月 16 日付で日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 所在の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託し、受託番号 F E R M B P - 7 5 9 2 として受託された。

<微生物 A 19 株>

10 A 細胞形態

(1) 肉汁寒天培養、27℃

通常 0.4 乃至 0.8  $\mu\text{m}$   $\times$  1.0 乃至 4.0  $\mu\text{m}$  の桿菌。多形性あり。運動性なし。無孢子。グラム陽性。

(2) E Y G 寒天培地、27℃

15 桿菌-球菌の生育サイクルを示す。

B 培養性質

(1) 肉汁寒天平板培養、27℃

形状：円形、大きさは 1 日間で 2 乃至 3 mm

周縁：全縁

20 隆起：半レンズ状

光沢：鈍光

表面：平滑

色調：不透明、黄色

(2) 肉汁寒天斜面培養、27℃

25 生育：中程度

形状：糸状

(3) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27℃



液化しない。

C 生理学的性質

- (1) 澱粉の加水分解： 陰性
- (2) 色素の生成： 可溶性の色素の生成はない
- 5 (3) ウレアーゼ： 陽性
- (4) オキシダーゼ： 陽性
- (5) カタラーゼ： 陽性
- (6) 酸素に対する態度： 好気性
- (7) 細胞壁の主要ジアミノ酸： リジン
- 10 (8) 細胞壁のペプチドグリカン型： リジン－アラニン
- (9) 細胞壁のN－アシル型： アセチル
- (10) 細胞壁の構成糖： ガラクトース、グルコース、ラムノース、マンノース
- (11) ビタミンの要求性： なし
- 15 (12) DNAのGC含量： 62%
- (13) DNA－DNAホモロジー： アルスロバクター・グロビホルミス(ATCC 8010)との間で66.5%のDNA－DNAホモロジーを示す

以上の菌学的性質に基づいて、『バーギーズ・マニュアル・オブ・シ  
20 ステマティック・バクテリオロジー(Bergey's Manual  
of Systematic Bacteriology』、第2巻  
(1986年)を参考にして、公知菌との異同を検討した。その結果、  
本菌は、アルスロバクター・グロビホルミス(Bacillus globiformis)に属する新規微生物であり、 $\alpha$ －イソマルトシル  
25 グルコ糖質から $\alpha$ －イソマルトシル基を転移して環状四糖を生成する本  
発明の $\alpha$ －イソマルトシル転移酵素を産生する文献未記載の特徴を有す

る微生物であることが判明した。

これらの結果より、本発明者等は、本菌をアルスロバクター・グロビホルミス A 1 9 と命名し、平成 1 3 年 5 月 1 6 日付で日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 所在の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託し、受託番号 F E R M B P - 7 5 9 0 として受託された。

本発明には、上記菌株はもとより、それらの変異株、更には、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素産生能を有する他の微生物、及びそれらの変異株も包含されることは言うまでもない。

本発明の微生物の培養に用いる培地は、当該微生物が生育でき、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を産生しうる栄養培地であればよく、合成培地及び天然培地のいずれも用いることができる。炭素源としては、当該微生物の生育に利用できるものであればよく、例えば、植物由来の澱粉やフィトグリコーゲン、動物や微生物由来のグリコーゲンやプルラン、また、これらの部分分解物、D-グルコース、D-フラクトース、ラクトース、スクロース、マンニトール、L-ソルビトール、糖蜜などの糖質、また、クエン酸、コハク酸などの有機酸などを適宜用いることができる。培地中のこれらの炭素源の濃度は、炭素源の種類により適宜選択すればよい。窒素源としては、例えば、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物、及び尿素、コーン・ステープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物などを適宜用いることができる。また、無機成分としては、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、及びコバルト塩などの塩類を適宜用いることができる。更に、必要に応じて、アミノ酸類、ビタミン類なども適宜用いることができる。

本発明の微生物の培養は、通常、4 乃至 4 0 °C、好ましくは、2 0 乃

至 37℃、pH 4 乃至 10、好ましくは、pH 5 乃至 9 から選ばれる条件で好氣的に行われる。培養時間は、当該微生物が増殖し得る時間であればよく、好適には、10 時間乃至 150 時間とする。また、培養液の溶存酸素濃度は特に制限はないが、通常、0.5 乃至 20 ppm の範囲となるように、通気量を調節したり、攪拌したり、通気に酸素を使用又は追加したり、また、フーメンター内の圧力を高めるなどの手段を適宜採用する。また、培養方式は、回分培養又は連続培養のいずれでもよい。

当該酵素活性は、菌体を含め培養物全体に認められることから、このようにして得られる培養物をそのまま粗酵素液として用いることも、また、斯かる培養物から菌体を破碎又は除去した後の培養液を粗酵素液として用いることもできる。培養物から菌体を除去する方法としては、公知の固液分離法を採用できる。例えば、培養物そのものを遠心分離する方法、あるいは、プレコートフィルターなどを用いて濾過分離する方法、平膜、中空糸膜などの膜濾過により分離する方法などが適宜採用される。前述のように、菌体除去後の培養液は粗酵素液として用いることができ、一般的には、硫酸塩析法、アセトン及びアルコール沈殿法、平膜、中空膜などの膜濃縮法により当該酵素を濃縮して利用する。

前記粗酵素液、濃縮酵素液中に含まれる本発明の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素、及び以下に述べる精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、公知の方法により固定化して用いることもできる。その固定化方法としては、例えば、イオン交換体への結合法、樹脂及び膜などとの共有結合法・吸着法、高分子物質を用いる包括法などを適宜採用できる。

本発明の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を分離・精製するには、酵素や蛋白質を分離・精製するための公知の方法を適宜組み合わせて実施することができる。その具体例としては、例えば、前記粗酵素液や濃縮

酵素液を硫酸塩析して濃縮し、透析後、『セパビーズ (Sepabeads) FP-DA13』ゲルを用いる陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いるアフィニティークロマトグラフィー、『ブチルトヨパール (Butyl-Toyoparl) 650M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー、及び『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いるアフィニティークロマトグラフィーを順次適用することにより、電気泳動的に単一な本発明の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を得ることができる。

10      このようにして得られる本発明の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、 $\alpha$ -イソマルトシルグルコ糖質から $\alpha$ -イソマルトシル転移を含む反応によって環状四糖を生成する酵素であって、詳細には、下記の理化学的性質を有する。

(1)      作用

15      非還元末端の結合様式として $\alpha$ -1, 6グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha$ -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から、 $\alpha$ -イソマルトシル転移を含む反応によって、サイクロ { $\rightarrow$ 6} - $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ 3) - $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ 6) - $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ 3) - $\alpha$ -D-グルコピラノシル- (1 $\rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖を生成する。

(2)      分子量

SDS-ゲル電気泳動法において約82,000ダルトン乃至約136,000ダルトンの範囲内に確認される分子量を有する。

25      (3)      等電点

アンフォライン含有電気泳動法においてpI約3.7乃至pI約8.

3 の範囲内に確認される等電点を有する。

(4) 至適温度

pH 6.0、30 分間反応の条件下において約 45℃乃至約 50℃の範囲内に確認される至適温度を有する。

5 (5) 至適 pH

35℃、30 分間反応の条件下において pH 約 5.5 乃至 pH 約 6.5 の範囲内に確認される至適 pH を有する。

(6) 温度安定性

10 pH 6.0、60 分間保持の条件下における安定温度域を約 45℃以下に有する。

(7) pH 安定性

4℃、24 時間保持の条件下における安定 pH 域を pH 約 3.6 乃至 pH 約 10.0 の範囲内に有する。

(8) N 末端アミノ酸配列

15 N-末端アミノ酸配列として、イソロイシン-アスパラギン酸-グリシン-バリン-チロシン-ヒスチジン-アラニン-プロリン（配列表における配列番号 1）又はアスパラギン酸-スレオニン-ロイシン-セリン-グリシン-バリン-フェニルアラニン-ヒスチジン-グリシン-プロリン（配列表における配列番号 8）で表されるアミノ酸配列を有する  
20 場合がある。

本発明の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させて環状四糖を生成させるための基質としては、非還元末端の結合様式として  $\alpha$ -1, 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として  $\alpha$ -1, 4 グルコシル結合を有しているグルコース重合度が 3 以上の糖質、例えば、  
25 パノース、イソマルトシルマルトースなどが有利に用いられる。パノースを調製するには、例えば、プルランを酸加水分解したり、プルランを

サーモアクチノマイセス (Thermoactinomyces)  $\alpha$ -  
アミラーゼやネオプルラナーゼで分解したり、マルトースに $\alpha$ -グルコ  
シダーゼを作用させたり、マルトースとスクロースとの混合物にデキス  
トランスクラーゼを作用させ転移させるなどの方法が有利に採用できる  
5 。イソマルトシルマルトースを調製するには、例えば、プルランに $\beta$ -  
アミラーゼとプルラナーゼとを同時に作用させ加水分解したり、アミロ  
ペクチンやグリコーゲンを細菌糖化型 $\alpha$ -アミラーゼで加水分解したり  
、マルトトリオースに $\alpha$ -グルコシダーゼを作用させたり、マルトトリ  
オースとスクロースとの混合物にデキストランスクラーゼを作用させる  
10 などの方法が有利に採用できる。

本発明の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を基質に作用させるに際し、そ  
の基質濃度は特に限定されず、例えば、基質濃度 0.1 w/v % の比較  
的低濃度の溶液を用いた場合でも、本発明の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵  
素の反応は進行して環状四糖を生成する。工業的には、基質濃度 1 w/  
15 v % 以上、望ましくは、10 w/v % 以上が好適であり、この条件下で  
、環状四糖を有利に生成できる。また、基質溶液としては、完全には溶  
けきらない不溶性の基質を含有するまでの高濃度の基質溶液であっても  
よい。反応温度は反応が進行し得る温度、即ち、60℃付近以下の温度  
が望ましく、より望ましくは、30乃至50℃付近の温度が用いられる  
20 。反応 pH は、通常、pH 3.6 乃至 9 の範囲に調整すればよく、望ま  
しくは、pH 約 5.5 乃至 pH 7 の範囲とする。酵素の使用量と反応時間  
とは密接に関係しており、目的とする酵素反応の進行の程度により適宜  
選択すればよい。

上記の酵素反応によって得られた溶液は、通常、環状四糖と共にグル  
25 コース、マルトース、更には、残存する基質としての非還元末端の結合  
様式として $\alpha$ -1,6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結



合様式として $\alpha$ -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質などを含有しており、そのまま環状四糖含有糖液として用いることができる。また、必要に応じて、 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させた後に、例えば、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ及び $\alpha$ -グルコシダーゼから選ばれる1種又は2種以上を作用させて、夾雑するオリゴ糖を加水分解した環状四糖含有液として用いることもできる。一般的には、更に、精製して用いる。その精製方法としては、公知の方法を適宜採用すればよく、例えば、活性炭による脱色、H型、OH型イオン交換樹脂による脱塩、イオン交換カラムクロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィーによる分画、アルコールおよびアセトンなど有機溶媒による分別、適度な分離性能を有する膜による分離、更には、環状四糖を利用せず夾雑糖質を資化又は分解する微生物、例えば、乳酸菌、酢酸菌、酵母などによる発酵処理、アルカリ処理などにより残存する還元性糖質を分解除去するなどの1種又は2種以上の精製方法が適宜採用できる。

とりわけ、環状四糖の工業的大量製造方法としては、イオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーが好適であり、例えば、特開昭58-23799号公報又は特開昭58-72598号公報などに開示されている強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより、環状四糖以外の夾雑糖類を除去し、含有量を高めた環状四糖、又はこれを含む糖質水溶液を有利に製造することができる。このカラムクロマトグラフィーに於いては、固定床方式、移動床方式、擬似移動床方式、バッチ方式、半連続方式、連続方式のいずれの方式も適宜採用することができる。

このようにして得られた環状四糖を含む水溶液、又はその含量を向上



させた糖質水溶液は、通常、環状四糖を、固形物当り、 $10\text{ w/w}\%$ （以下、本明細書では、特にことわらない限り、「 $\text{w/w}\%$ 」を「 $\%$ 」と略記する。）以上、望ましくは $40\%$ 以上含有する糖質水溶液で、通常、これを濃縮し、シラップ状製品とする。このシラップ状製品は、更に  
5 乾燥して粉末状製品にすることも随意である。

更には、本発明における環状四糖の結晶を製造するには、通常、前記精製方法により得られる環状四糖を含有する糖質水溶液、望ましくは、環状四糖を固形物当り約 $40\%$ 以上、更に望ましくは $50\%$ 以上含有する糖質水溶液が好適に用いられる。結晶形態として、5乃至6含水結晶  
10 を製造する場合には、通常、斯かる糖質水溶液を環状四糖の過飽和水溶液、例えば、濃度約 $40\%$ 乃至 $90\%$ 環状四糖水溶液とし、これを助晶缶にとり、約 $0.1$ 乃至 $20\%$ の種結晶共存下で、過飽和を保てる温度、望ましくは、 $10$ 乃至 $90^\circ\text{C}$ の範囲で攪拌しつつ徐冷し、結晶を含有するマスキットを製造する。環状四糖1含水結晶や無水結晶を晶出させる  
15 場合には、一般的には、より高濃度、高温度での過飽和条件が採用される。マスキットから環状四糖の結晶又はこれを含有する含蜜結晶を製造する方法は、例えば、分蜜方法、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法などの公知の方法を適宜採用すればよい。環状四糖1含水結晶や無水結晶は、環状四糖5乃至6含水結晶を脱水又は乾燥させて製  
20 造することもできる。このようにして製造される本発明の環状四糖結晶又はその高含有粉末は、上品で温和な低甘味を有する非還元性乃至低還元性の白色粉末乃至固形物で、耐酸性、耐熱性に優れた安定な糖質であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、蛋白質などのアミノ酸含有物質と混合し、加工しても、褐変や異臭を発生することは少なく、  
25 混合した他の素材を損なうことも殆どない。また、自体吸湿性も低く、粉末状でも付着・固結防止性を有している。

また、本発明の環状四糖は、包接能を有していることから、殊に、揮散し易い香気成分、有効成分などの揮散防止、品質劣化防止、安定化保持などに極めて優れた効果を発揮し、保香剤、安定剤などとして好適に使用できる。この際、必要に応じて、他の環状糖質、例えば、環状デキストリン類、分岐環状デキストリン類、環状デキストラン類、環状フラクタン類などと併用して、安定性を強化することも有利に実施できる。

更に、アミラーゼや $\alpha$ -グルコシダーゼによって実質的に分解されないことから、経口摂取しても実質的に消化吸収されず、また、腸内細菌によって醗酵されにくく、極めて低カロリーの水溶性食物繊維として利用することができる。換言すれば、本発明の環状四糖を経口摂取すれば、糖質としての重量、容量があるので、満腹感が得られる一方、本発明の環状四糖は、実質的に消化されないことから、低カロリー食品素材、ダイエット食品素材としても好適に使用できる。また、虫歯誘発菌などによっても醗酵されにくく、虫歯を起こしにくい甘味料としても好適に利用できる。

更に、本発明の環状四糖は、耐酸性、耐アルカリ性、耐熱性に優れた無毒、無害の安全な天然甘味料であることから、結晶製品の場合、プルラン、ヒドロキシエチルスターチ、及びポリビニルピロリドンなどの1種又は2種以上の結合剤と併用して錠剤や糖衣錠として利用することもできる。また、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、離水防止性、固結防止性、保香性、変色防止性、安定性、他の糖の晶出防止性、難醗酵性、澱粉老化防止性、蛋白質変性防止性、脂質劣化防止性などの種々の性質をも具備している。

従って、本発明の環状四糖、又はこれを含む糖質は、甘味料、難醗酵性食品素材、難消化性食品素材、低う蝕性食品素材、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、固結防止剤、

保香剤、変色防止剤、澱粉老化防止剤、蛋白質変性防止剤、脂質劣化防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、そのまま、又は必要に応じて、当該糖質と公知材料と適宜併用して、例えば、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用5 できる。公知の材料としては、例えば、呈味料、着色料、着香料、強化剤、乳化剤、酸化防止剤、紫外線防止剤、又は薬効成分などが適宜利用できる。

本発明の環状四糖又はこれを含む糖質は、そのまま甘味付のための調味料として使用できる。必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、果糖、10 異性化糖、砂糖、麦芽糖、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース、蜂蜜、メープルシュガー、エリスリトール、キシリトール、ソルビトール、マルチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、 $\alpha$ -グリコシルステビオシド、ラカンカ甘味物、グリチルリチン、ソーマチン、L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、アセスルファムK、スク15 ラロース、グリシン、アラニンなどの他の甘味料と併用することも、また、デキストリン、澱粉、乳糖などのような増量剤と併用することもできる。とりわけ、エリスリトール、キシリトール、マルチトールなどの低カロリー甘味料や $\alpha$ -グリコシルステビオシド、ソーマチン、L-ア20 スパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、アセスルファムK及びスクラロースなどの1種又は2種以上の高甘味度甘味料と併用して、低カロリー甘味料又はダイエット甘味料などとして好適に利用することができる。

また、本発明の環状四糖、又はこれを含む糖質の粉末乃至結晶状製品は、そのまま、又は必要に応じて、増量剤、賦形剤、又は結合剤など25 と混合して、顆粒状、球状、短棒状、板状、立方体状、又は錠剤などの各種形状に成形して使用することも随意である。

また、本発明の環状四糖、又はこれを含む糖質の甘味は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の呈味を有する各種の物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の甘味付、呈味改良、風味改良、或いは品質改良などに有利に利用できる。

5       例えば、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、ふりかけ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麵つゆ、ソース、ケチャップ、焼き肉のたれ、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、複合調味料、みりん、新みりん、  
10       テーブルシュガー、コーヒーシュガーなどの各種調味料に、甘味料、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤などとして利用することができる。  
      また、例えば、せんべい、あられ、おこし、求肥、餅類、まんじゅう、  
      ういろう、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、  
      バタークリーム、カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、  
15       スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、ヌガー、キャンディーなどの各種洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、  
      果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペーストなどのペースト類、  
      ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、  
20       福神漬け、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の素などの漬物の素、  
      ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、カマボコ、チクワ、天ぷらなどの魚肉製品、  
      ウニ、イカの塩辛、酢コンブ、さきするめ、ふぐのみりん干し、タラ、タイ、エビなどの田麩などの各種珍味類、海苔、山菜、  
25       するめ、小魚、貝などで製造される佃煮類、煮豆、ポテトサラダ、コンブ巻などの惣菜食品、乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜の瓶詰、缶詰

類、合成酒、造醸酒、清酒、果実酒、発泡酒、ビールなどの酒類、珈琲、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席ジュース、即席コーヒー、即席しるこ、即席スープなどの即席食品、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤、アミノ酸含有飲料、ペプチド食品、冷凍食品などの各種飲食物への甘味付、呈味改良、風味改良、或いは品質改良などに有利に利用できる。

また、家畜、家禽、その他、蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のための飼料、餌料などの嗜好性を向上又はカロリーを低減させるなどの目的で使用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、内服液、錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うがい剤など、固形物、粉末、ペースト状、液状などの各種形態にある嗜好物、化粧品、医薬品などの各種組成物への甘味剤として、又は呈味改良剤、矯味剤として、更には品質改良剤、安定剤などとしても有利に利用できる。

品質改良剤や安定剤への用途としては、各種有用成分や活性を失い易い各種生理活性物質、又はこれを含む健康食品、化粧品及び医薬品などに有利に利用できる。例えば、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\gamma$ 、ツモア・ネクロシス・ファクター $\alpha$ 、ツモア・ネクロシス・ファクター $\beta$ 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスファーファクター、インターロイキンなどのサイトカイン含有液、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エритроποιηチン、卵細胞刺激ホルモンなどのホルモン含有液、BCGワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤含有液、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイ

クリン、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質含有液、チアミン、リボフラビン、L-アスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン含有液、EPA、DHA、アラキドン酸などの高度不飽和脂肪酸又はそのエステル誘導体、  
5 リパーゼ、エステラーゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナーゼ、ラクターゼなどの酵素含有液、薬用人参エキス、スッポンエキス、クロレラエキス、アロエエキス、クマザサエキス、モモの葉エキス、ビワの葉エキス、ユズの皮エキス、プロポリスエキスなどのエキス類、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌ペースト、ローヤルゼリーなどの各種生理活性物質に本発明の環状四糖、  
10 又はこれを含む糖質を配合することにより、それらの有効成分、活性を失うことなく、安定で高品質の液状、ペースト状、固状又は粉末状の健康食品、化粧品、医薬品などを容易に製造できる。

上記で述べた、本発明の環状四糖又はこれを含む糖質による、香気成分の揮散防止（保香）、活性成分の劣化防止、保湿、離水防止、他の糖質の晶出防止、蛋白質変性防止、脂質劣化防止、乳化状態の安定化などの効果や、それ自体の安定性・賦形性などは、当然のことながら、皮膚外用に通常利用される他の成分と配合した場合にも効果的に発揮される。  
15 そして、本発明の環状四糖又はこれを含む糖質は、他の天然の糖質と同様に、皮膚に適用したときの刺激が極めて低く、かつ、皮膚における水分の保持にも奏功するので、当該糖質は、皮膚外用組成物に配合して利用することも有利に実施できる。斯かる皮膚外用組成物において、本発明の環状四糖又はこれを含む糖質は、通常、皮膚への適用が許容される他の成分の1種又は2種以上、例えば、皮膚への外用が許容される、  
20 油脂類、ロウ類、炭化水素類、脂肪酸類、エステル類、アルコール類、界面活性剤、色素、香料、ホルモン類、ビタミン類、植物エキス、動物



エキス、微生物エキス、塩類、紫外線吸収剤、感光色素、抗酸化剤、防腐・殺菌剤、制汗・消臭剤、清涼剤、キレート剤、糖質、アミノ酸類、増粘剤などから適宜選ばれる１種又は２種以上とともに配合される。当該皮膚外用組成物は、例えば、化粧品分野においては、ローション、ク  
5 リーム、乳液、ゲル、粉末、ペースト、ブロックなどの形態で、石けん、化粧石けん、肌洗い粉、洗顔クリーム、洗顔フォーム、フェイシャルリンス、ボディーシャンプー、ボディーリンス、シャンプー、リンス、髪洗い粉などの清浄用化粧品、セットローション、ヘアブロー、チック、ヘアクリーム、ポマード、ヘアスプレー、ヘアリキッド、ヘアトニック、ヘアローション、養毛料、染毛料、頭皮用トリートメント、びん付  
10 油、つや出し油、髪油、スキ油などの頭髪化粧品、化粧水、バニシングクリーム、エモリエントクリーム、エモリエントローション、パック用化粧料（ゼリー状ピールオフタイプ、ゼリー状ふきとり型、ペースト状洗い流し型、粉末状など）、クレンジングクリーム、コールドクリーム、  
15 ハンドクリーム、ハンドローション、乳液、保湿液、アフターシェービングローション、シェービングローション、プレシェーブローション、アフターシェービングクリーム、アフターシェービングフォーム、プレシェーブクリーム、化粧用油、ベビーオイルなどの基礎化粧品、ファンデーション（液状、クリーム状、固型など）、タルカムパウダー、ベ  
20 ビーパウダー、ボディパウダー、パヒュームパウダー、メイクアップベース、おしろい（クリーム状、ペースト状、液状、固型、粉末など）、アイシャドウ、アイクリーム、マスカラ、眉墨、まつげ化粧料、頬紅、頬化粧水などのメイクアップ化粧品、香水、練香水、粉末香水、オーデ  
25 コロン、パフュームコロン、オードトワレなどの芳香化粧品、日焼けクリーム、日焼けローション、日焼けオイル、日焼け止めクリーム、日焼け止めローション、日焼け止めオイルなどの日焼け・日焼け止め化粧品



、マニキュア、ペディキュア、ネイルカラー、ネイルラッカー、エナメルリムーバー、ネイルクリーム、爪化粧料などの爪化粧品、アイライナー化粧品、口紅、リップクリーム、練紅、リップグロスなどの口唇化粧品、練歯磨、マウスウォッシュなどの口腔化粧品、バスソルト、バスオイル、浴用化粧料などの入浴用化粧品などの用途に利用されるよう提供される。また、例えば、医薬品分野においては、当該皮膚外用組成物は、湿布剤、噴霧剤、塗布剤、浴剤、貼付剤、軟膏剤、パスタ剤、リニメント剤、ローション剤、パップ剤などの形態で提供される。

本発明の環状四糖又はこれを含む糖質とともに皮膚外用組成物に配合することができる他の成分を以下より具体的に述べると、油脂類としては、例えば、アボガド油、アーモンド油、オリーブ油、ゴマ油、サフラワー油、大豆油、ツバキ油、パーシック油、ヒマシ油、綿実油などの植物油（常温で液体）、カカオ脂、ヤシ脂、パーム油、モクロウなどの植物脂（常温で固体）、ミンク油、卵黄油、タートル油などの動物油が挙げられる。

本発明で利用できるロウ類としては、例えば、ホホバ油、カルナウバロウ、キャンデリラロウなどの植物性ロウ、マッコウ鯨油、槌鯨油、ミツロウ、鯨ロウ、ラノリンなどの動物性ロウ、モンタンロウなどの鉱物性ロウが挙げられる。

本発明で利用できる炭化水素類としては、例えば、パラフィン（別名「固形パラフィン」）、流動パラフィン、セレシン、マイクロクリスタリンワックス、ワセリンなどの鉱物性炭化水素、スクワラン、スクワレンなどの動物起源の炭化水素が挙げられる。

本発明で利用できる脂肪酸類としては、例えば、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、ベヘニン酸、ウンデシレン酸、ラノリン脂肪酸、硬質ラノリン脂肪酸、軟質ラノリン脂肪

酸、イソステアリン酸ならびにこれらの化合物の誘導体が挙げられる。

本発明で利用できるアルコール類としては、例えば、ラウリルアルコール、セタノール、セトステアリルアルコール、ステアリルアルコール、オレイルアルコール、ベヘニルアルコール、ラノリンアルコール、水添ラノリンアルコール、ヘキシルデカノール、オクチルドデカノール、  
5 ポリエチレングリコールなどの高級アルコール（多価アルコールを含む）、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリンなどの低級アルコール（多価アルコールを含む）ならびにこれらの化合物の誘導体が挙げ  
10 られる。

本発明で利用できるエステル類としては、例えば、ラウリン酸ヘキシル、ミリスチン酸イソプロピル、ミリスチン酸ミリスチル、ミリスチン酸セチル、ミリスチン酸オクチルドデシル、パルミチン酸イソプロピル、ステアリン酸ブチル、ステアリン酸コレステリル、酢酸コレステリル、  
15 n-酪酸コレステリル、カプロン酸コレステリル、ラウリン酸コレステリル、ミリスチン酸コレステリル、パルミチン酸コレステリル、ステアリン酸コレステリル、1,2-ヒドロキシステアリン酸コレステリル、オレイン酸デシル、オレイン酸オクチルドデシル、ラノリン脂肪酸イソプロピル、トリミリスチン酸グリセリン、ジオレイン酸プロピレングリ  
20 コール、乳酸ミリスチル、乳酸セチル、酢酸ラノリン、ジメチルオクタン酸ヘキシルデシルならびにこれらの化合物の誘導体が挙げられる。

本発明で利用できる界面活性剤としては、例えば、ラウリン酸亜鉛、ミリスチン酸亜鉛、パルミチン酸亜鉛、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、セチル硫酸  
25 ナトリウム、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸トリエタノールアミン、ポリ

オキシエチレンセチルエーテルリン酸、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルリン酸、ラウロイルサルコシナトリウム、ヤシ油脂肪酸サルコシントリエタノールアミン、ヤシ油脂肪酸メチルタウリンナトリウム、大豆リン脂質などの陰イオン性界面活性剤、塩化ステアリルトリメチルアンモニウム、塩化ジステアリルジメチルアンモニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化セチルピリジニウム、臭化アルキルイソキノリニウム、ドデシルジメチル 2-フェノキシエチルアンモニウムブロマイドなどの陽イオン性界面活性剤、 $\beta$ -ラウリルアミノプロピオン酸ナトリウム、ラウリルジメチルアミノ酢酸ベタイン、2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタインなどの両イオン性界面活性剤、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン、親油型モノステアリン酸グリセリン、ジオレイン酸プロピレングリコール、モノラウリン酸ソルビタン、モノオレイン酸ソルビタン、ショ糖脂肪酸エステル、ウンデシレン酸モノエタノールアミド、ヤシ油ジエタノールアミド、モノオレイン酸ポリエチレングリコール、乳酸ミリスチル、乳酸セチル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビット、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、モノステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、トリオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビット、ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油などの非イオン性界面活性剤や、以上の化合物の誘導体が挙げられる。

本発明で利用できる色素としては、例えば、アマランス、エリスロシン、ローズベンガル、アシッドレッド、レーキレッド C、リソールレッド、ローダミン、ブリリアントレーキレッド、エオシン Y S、ビオラミン R、ブリリアントファストスカーレット、ボンソー R などの赤色ター

ル系色素、ジプロモフルオレセイン、パーマネントオレンジ、エリスロ  
シン黄N A、オレンジIなどの橙色タール系色素、タートラジン、サン  
セットエロー、ウラニン、ベンチジンエローG、ナフトールエローS、  
エローABなどの黄色タール系色素、ファストグリーンFCF、アリザ  
5 ニンシアニンググリーンF、ライトグリーンSF黄、ナフトールグリーン  
Bなどの緑色タール系色素、ブリリアントブルーFCF、インジゴカル  
ミン、インジゴ、パテントブルーNA、カルバンスレンブルー、スダン  
ブルーなどの青色タール系色素、レゾルシンブラウンなどの褐色タール  
系色素、アリズリンパープル、アリズロールパープルなどの紫色タール  
10 系色素、ナフトールブルーブラックなどの黒色タール系色素、酸化亜鉛  
、酸化チタン、水酸化コバルト、水酸化アルミニウム、タルク、カオリ  
ン、雲母、ベントナイト、マンガンバイオレット、雲母チタンなどの無  
機顔料、 $\beta$ -カロチン、リコピン、クロシンなどのカロチノイド系色素  
、シソニン、サフロールイエロー、ルチン、ケルセチンなどのフラボノ  
15 イド系色素、リボフラビンなどおフラビン系色素、コチニール、アリザ  
ニン、シコニンなどのキノン系色素や、以上の化合物の誘導体が挙げら  
れる。

皮膚外用もしくは化粧品用に一般に利用される香料は、大別すると、  
天然香料である動物性香料及び植物性香料のほか、合成香料及びこれら  
20 を適宜配合した調合香料に分類される。本発明で利用できる動物性香料  
としては、例えば、じゃ香、霊猫香、海猫香、龍涎香などが挙げられる  
。植物性香料としては、例えば、アニスの実、バジルの葉、キャラウェ  
イの果実、シナモンの樹皮、コリアンダーの種子、ラベンダーの花、ナ  
ツメグの種子、ペパーミントの葉、バラの花、ローズマリーの花種又は  
25 葉、タイムの葉などから水蒸気蒸留などによって得られる留出物（精油  
類）、ヒアシンスの花、ジャスミンの花、ミモザの花、バラの花、バニ

ラの種子などから得られる抽出物（一般に、性状、製法によってアブソリュート類、レジノイド類、オレオレジン類、チンキ類に分類される）などが挙げられる。合成香料としては、例えば、アセトフェノン、アネソール、ベンジルアルコール、酢酸ブチル、カンフル、シトラール、シトロネロール、クミンアルデヒド、エストラゴール、エチルバニリン、酢酸ゲラニル、リナロール、メントール、メチルp-クレゾール、サリチル酸メチル、フェニル酢酸、バニリンならびにこれらの化合物の誘導体が挙げられる。また、本発明においては、以上のような香料を適宜配合した調合香料を利用することもできる。

本発明で利用できるホルモン類としては、例えば、エストロン、エストラジオールなどの卵胞ホルモン類、プロゲステロン、プレグノロンなどの黄体ホルモン類、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロンなどの副腎皮質ホルモン類が挙げられ、ビタミン類としては、例えば、レチノール、レチノイン酸、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、及び $\gamma$ -カロテン、これらの誘導体などのビタミンAに属する化合物、チアミン（ビタミンB<sub>1</sub>）、リボフラビン（ビタミンB<sub>2</sub>）、ピリドキシン、ピリドキサール、ピリドキサミン（以上ビタミンB<sub>6</sub>）、これらの誘導体などのビタミンBに属する化合物、L-アスコルビン酸や、2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸をはじめとするグリコシル-L-アスコルビン酸、L-アスコルビンもしくはグリコシル-L-アスコルビン酸のアシル化誘導体（別名「脂溶性ビタミンC」）、L-アスコルビン酸硫酸エステルなどのL-アスコルビン酸誘導体などのビタミンCに属する化合物、エルゴカルシフェロール、コレカルシフェロール、これらの誘導体などのビタミンDに属する化合物、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、及び $\delta$ -トコフェロール、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、及び $\delta$ -トコトリエノール、これらの誘導体などのビタミンEに属する化合物が挙げられる。

本発明で利用できる植物抽出物としては、上記で述べた香料として利用される植物抽出物以外に、例えば、カミツレ抽出物、セージ抽出物、アロエ抽出物、サルビア抽出物、アシタバ抽出物、アボガド抽出物、イラクサ抽出物、ウイキョウ抽出物、ウーロン茶抽出物、オウバク抽出物、オオムギ抽出物、オクラ抽出物、オーリス抽出物、海藻抽出物、カリ  
ン抽出物、カンゾウ抽出物、クインスシード抽出物、クチナシ抽出物、クマザサ抽出物、ケイヒ抽出物、紅茶抽出物、コメヌカ抽出物、コメヌ  
カ発酵抽出物、ステビア抽出物、セロリ抽出物、センブリ抽出物、ダイ  
ズ抽出物、タイム抽出物、茶抽出物、ツバキ抽出物、トウキ抽出物、ト  
ウモロコシ抽出物、ニンジン抽出物、ハマナス抽出物、ヒノキ抽出物、  
ヘチマ抽出物、ベニバナ抽出物、マツ抽出物、モモ抽出物、ユーカリ抽  
出物、ユキノシタ抽出物、ユズ抽出物、ユリ抽出物、ヨクイニン抽出物  
、ヨモギ抽出物、藍藻抽出物、海藻抽出物、リンゴ抽出物、レイシ抽出  
物、レタス抽出物のほか、ヒノキチオール、アズレン、クロロフィル、  
グリチルリチンなどの植物からの単離化合物などが挙げられる。本発明  
で利用できる動物抽出物としては、例えば、胎盤抽出物が挙げられる。  
本発明で利用できる微生物エキスとしては、例えば、酵母エキスが挙げ  
られる。当該皮膚外用組成物において、塩類としては、皮膚外用が通常  
許容されている塩類が一般に利用できるほか、海水、海洋深層水、海水  
乾燥物、鉱泉塩などの天然塩（溶液を含む）も有利に利用できる。

本発明で利用できる紫外線吸収剤としては、例えば、パラアミノ安息  
香酸エチル、パラジメチルアミノ安息香酸エチルヘキシルエステル、シ  
ノキサート、パラメトキシ桂皮酸エチルヘキシルエステル、2-（2-  
ヒドロキシ-5-メチルフェニル）ベンゾトリアゾール、オキシベンゾ  
ゾン、ウロカニン酸、ウロカニン酸エチルならびにこれらの化合物の誘  
導体のほか、5-クロロウラシル、グアニン、シトシンなどの紫外線遮



蔽能を有する有機物質が挙げられ、感光色素としては、例えば、2, 2'-[3'-[2-(3-ヘプチル-4-メチル-2-チアゾリン-2-イリデン)エチリデン]プロペニレン]ビス[3-ヘプチル-4-メチル]チアゾリニウムヨーダイド(別名「プラトニン」)、2-[2-(3-ヘプチル-4-メチル-2-チアゾリン-2-イリデン)メチン]-3-ヘプチル-4-メチルチアゾリニウムヨーダイド(別名「ピオニン」)、6-[2-[(5-ブロモ-2-ピリジル)アミノ]ビニル]-1-エチル-2-ピコリニウムヨーダイド(別名「タカナール」)、2-(2-アニリノビニル)-3, 4-ジメチル-オキサゾリニウムヨーダイド(別名「ルミネキス」)ならびにこれらの化合物の誘導体が挙げられる。

本発明で利用できる抗酸化剤としては、既に述べた成分で抗酸化作用を有するものの他、例えば、没食子酸プロピル、没食子酸ブチル、没食子酸オクチル、没食子酸ドデシル、ノルジヒドロガイアレン酸(別名「NDGA」)、ブチルヒドロキシアニソール(別名「BHA」)、ジブチルヒドロキシトルエン(別名「BHT」)、4-ヒドロキシメチル1-2, 6-ジターシャリーブチルフェノールならびにこれらの化合物の誘導体が挙げられる。

本発明で利用できる防腐・殺菌剤としては、既に述べた成分で防腐又は殺菌作用を有するモノの他、例えば、フェノール、パラクロロメタクレゾール、レゾルシン、パラオキシ安息香酸エステル、クレゾールなどのフェノール類、安息香酸、ソルビン酸、サリチル酸、ほう酸などの酸類(いずれも塩の形態を含む)、ヘキサクロロフェン、ビチオノール、ジクロロフェンなどのハロゲン化ビスフェノール類、3, 4, 4'-トリクロロカルバニリド、ウンデシレン酸モノエタノールアミドなどのアミド類、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化デカリニウム

などの4級アンモニウム化合物の他、塩酸クロルヘキシジン、1-ヒドロキシピリジン-2-チオン、塩化リゾチームや、以上の化合物の誘導体が挙げられる。

本発明で利用できる制汗・消臭剤としては、塩化アルミニウム、塩化  
5 亜鉛、クロルヒドロキシアルミニウム、アラントインクロルヒドロキシア  
ルミニウム、アラントインジヒドロキシアルミニウム、アルミニウム  
クロルヒドレート類などが挙げられ、清涼剤としては、例えば、メント  
ール、ハッカ油、ペパーミント油、カンフル、チモール、スピラントール、  
サリチル酸メチルなどが挙げられ、キレート剤としては、例えば、  
10 エチレンジアミン四酢酸誘導体、トリポリリン酸、ヘキサメタクリン酸  
、ジヒドロエチルグリシン、クエン酸、酒石酸、グルコン酸、糖酸が挙げ  
られる。

本発明で利用できる糖質としては、スクロース、マルトース、フラク  
トース、ラクトース、トレハロースなどの少糖類、シクロデキストリン  
15 類などの環状四糖以外の環状糖質類、マルチトール、ソルビトール、マ  
ンニトール、キシリトール、アラビトールなどの糖アルコール類、ヒア  
ルロン酸、コンドロイチン硫酸、プルラン、セルロース、デキストラン  
、ペクチン、カラギーナン、グアーガム、水飴、アラビアガム、トラガ  
ントガム、キチンなどの多糖類ならびにそれらの誘導体又は部分分解物  
20 が挙げられ、アミノ酸としては、グリシン、セリン、トレオニン、チロ  
シン、システイン、シスチン、アスパラギン、グルタミン、ピロリドン  
カルボン酸、ヒドロキシプロリン、ピペコリン酸、サルコシン、ホモシ  
ステイン、ホモセリン、シトルリン、アスパラギン酸、グルタミン酸、  
システインスルフィン酸、アルギニノコハク酸、アルギニン、リジン、  
25 ヒスチジン、オルニチン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン  
、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、プロリン、 $\beta$ -ア



ラニン、タウリン、 $\beta$ -アミノ酪酸、 $\gamma$ -アミノ酪酸や、以上の化合物の塩が挙げられる。

この発明で利用できる増粘剤としては、既述の成分で増粘作用を有するもののほか、例えば、クインスシード、アルギン酸ナトリウム、カチオン化セルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチル澱粉、アルギン酸プロピレングリコール、コラーゲン、ケラチン、カゼイン、アルブミン、ゼラチン、ヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウムクロリドエーテル、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルメチルエーテル、カルボキシビニルポリマーなどの水溶性高分子、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸ナトリウムなどの電解質のほか、各種の油分などが挙げられる。

以上述べたような各種組成物に環状四糖、又はこれを含む糖質を含有させる方法としては、その製品が完成するまでの工程で含有せしめればよく、例えば、混和、混捏、溶解、融解、浸漬、浸透、散布、塗布、被覆、噴霧、注入、晶析、固化などの公知の方法が適宜選ばれる。環状四糖の種々の特性、とりわけ包接作用や、経口摂取される組成物における呈味改良、風味改良などの特性をより効果的に発揮させるためには、環状四糖として、固形物当たり、通常、0.1%以上、より望ましくは、1%以上含有せしめるのが好適である。

以下、本発明を、実験により詳細に説明する。

#### 実験1 培養物からの非還元性環状糖質の調製

パノース（株式会社林原生物化学研究所製造）5w/v%、酵母抽出物（商品名『アサヒミースト』、アサヒビール株式会社製造）1.5w/v%、リン酸二カリウム0.1w/v%、リン酸一ナトリウム・12

水塩 0.06 w/v %、硫酸マグネシウム・7 水塩 0.05 w/v % 及び水からなる液体培地を、500 ml 容三角フラスコに100 ml 入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌し、冷却して、バチルス・グロビスポルスC9 (FERM BP-7143) を接種し、27℃、  
5 230 rpmで48時間回転振盪培養した後、遠心分離して菌体を除き培養上清を得た。更に、その培養上清をオートクレーブ(120℃、15分間)し、放冷した後、不溶物を遠心分離して除去し、上清を回収した。

得られた上清中の糖質を調べるため、展開溶媒としてn-ブタノール、  
10 ピリジンと水との混液(容量比で6:4:1)、薄層プレートとして、アルミプレート『キーゼルゲル60』(20×20 cm、メルク社製造)を用いて、2回展開するシリカゲル薄層クロマトグラフィー(以下、「TLC」と略記する。)を行ない、上清中の糖質を分離した。検出法として、分離した全糖質を硫酸-メタノール法で発色し、また、還元  
15 糖質をジフェニルアミン-アニリン法で発色して調べたところ、R<sub>f</sub>値が約0.31の位置に、硫酸-メタノール法で陽性、かつ、ジフェニルアミン-アニリン法で陰性の非還元性糖質が検出された。

得られた上清約90 mlをpH5.0、45℃に調整した後、α-グルコシダーゼ(商品名『トランスグルコシダーゼLアマノ』(天野製薬  
20 株式会社製造)を固形物1 g当り1,500単位とグルコアミラーゼ(ナガセ生化学工業株式会社販売)を固形物1 g当り75単位添加して24時間処理し、続いて、水酸化ナトリウムでpH12に調整し、2時間煮沸して、残存するパノースなど還元糖を分解した。不溶物を濾過して除去した後、イオン交換樹脂『ダイヤイオンPK218』と『WA30』  
25 』(三菱化学工業株式会社製造)を用いて脱色・脱塩し、更に、活性炭で脱色した後、カチオン交換樹脂『ダイヤイオンSK-1B』(三菱化

学工業株式会社製造)とアニオン交換樹脂『IRA411』(オルガノ株式会社製造)で再度脱塩し、精密濾過した後、エバポレーターで濃縮し凍結真空乾燥して固形物として約0.5gの糖質粉末を得た。

5 得られた糖質の組成を高速液体クロマトグラフィー法(以下、「HPLC」と略記する。)で調べたところ、図1に示すように、溶出時間10.84分に単一ピークが検出された。このピーク面積から、本糖質の純度は、99.9%以上であることが判明した。なお、HPLCは、『ショウデックス(Shodex)KS-801カラム』(昭和電工株式会社製造)を用い、その溶出条件としては、カラム内温度60℃、溶出  
10 液としての水の流速を0.5ml/minとし、溶出される糖質の検出は、示差屈折計『RI-8012』(東ソー株式会社製造)を用いて行なった。

また、還元力をソモギー・ネルソン法で測定したところ、その還元力は検出限界以下であり、本標品は実質的に非還元性の糖質であると判断  
15 した。

## 実験2 非還元性糖質の構造解析

実験1の方法で得られた非還元性糖質について、高速原子衝撃法により質量分析(通称FAB-MS)したところ、質量数649のプロトン  
20 付加分子イオンが顕著に検出され、本糖質の質量数は648であることが判明した。

また、常法に従って、硫酸を用いて加水分解し、ガスクロマトグラフィー法で構成糖を調べたところ、D-グルコースのみが検出されたことから、本糖質の構成糖はD-グルコースであることも判明した。質量数  
25 を考慮すると、本糖質はD-グルコース4分子からなる環状糖質であることが判った。

更に、本糖質を用いて核磁気共鳴法（以下、「NMR」と略記する）を行ったところ、図2に示す<sup>1</sup>H-NMRスペクトルと、図3に示す<sup>13</sup>C-NMRスペクトルが得られ、これらスペクトルにつき、既知糖質のものとの異同を比較したところ、『ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（European Journal of Biochemistry）』、641乃至648頁（1994年）に記載されている非還元性環状糖質〔サイクロ{→6}-α-D-グルコピラノシル-（1→3）-α-D-グルコピラノシル-（1→6）-α-D-グルコピラノシル-（1→3）-α-D-グルコピラノシル-（1→}〕のスペクトルと一致し、本糖質の構造が、図4に示す環状四糖、即ち、サイクロ{→6}-α-D-グルコピラノシル-（1→3）-α-D-グルコピラノシル-（1→6）-α-D-グルコピラノシル-（1→3）-α-D-グルコピラノシル-（1→}であることが判明した。

### 15 実験3 バチルス・グロビスポルスC9からのα-イソマルトシル転移酵素の生産

澱粉部分分解物（商品名『パインデックス#4』、松谷化学株式会社製造）4.0w/v%、酵母抽出物（商品名『アサヒミースト』、アサヒビール株式会社製造）1.8w/v%、リン酸ニカリウム0.1w/v%、リン酸ナトリウム・12水塩0.06w/v%、硫酸マグネシウム・7水塩0.05w/v%及び水からなる液体培地を、500ml容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌し、冷却して、バチルス・グロビスポルスC9（FERMBP-7143）を接種し、27℃、230rpmで48時間回転振盪培養して種培養液を得た。

容量30Lのファーマンターに種培養の場合と同組成の培地を約20

L 入れて、加熱滅菌し、冷却して 27℃とした後、種培養液 1 v / v %  
を接種し、27℃、pH 6.0 乃至 8.0 に保ちつつ、48 時間通気攪  
拌培養した。培養後の培養液中の本発明の酵素の酵素活性は約 1.5 単  
位 / ml であり、遠心分離 (10,000 rpm、30 分間) して回収  
5 した上清約 18 L の本酵素活性は約 1.5 単位 / ml (総活性約 26,  
900 単位) であった。なお、本酵素活性は次のようにして測定した。  
即ち、パノースを濃度 2 w / v % となるように 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解させ基質溶液とした。その基質溶液 0.5 ml に酵  
素溶液を 0.5 ml 加えて、35℃で 30 分間酵素反応した。その反応  
10 液を 10 分間煮沸して反応を停止させた後、その反応液中のグルコース  
量をグルコースオキシダーゼ法で定量した。 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵  
素の酵素活性 1 単位は、上記の条件下で 1 分間に 1  $\mu$ モルのグルコース  
を生成する酵素量とした。本明細書を通じて、 $\alpha$ -イソマルトシル転移  
酵素の酵素活性は、以上の用にして測定される単位を意味するものとす  
15 る。

#### 実験 4 バチルス・グロビスポルス C9 からの $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の精製

実験 3 で得られた培養上清約 18 L を 80% 飽和硫酸アンモニウムで塩析して 4  
20 ℃で 24 時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離 (10,000 rpm、30 分間) して回収し、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に  
溶解後、同緩衝液に対して透析して、本発明の酵素活性約 24,700  
単位を含む粗酵素液約 400 ml を得た。この粗酵素液を『セパビース  
(Sepabeads) FP-DA13』ゲル (三菱化学株式会社製造  
25 ) を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー (ゲル容量 1000 ml  
に供した。本酵素は、セパビース FP-DA13 ゲルに吸着せずに

、非吸着画分に溶出した。この酵素液を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲル (アマシャム・ファルマシア・バイオテク株式会社製造) を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィー (ゲル量 500 ml) に供した。本酵素は、セファクリル HR S-200 ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M のリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約 0 M 付近でゲルに吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を回収した。更に、本発明の酵素活性画分を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『ブチルトヨパール (Butyl-Toyoppearl) 650 M』ゲル (東ソー株式会社製造) を用いた疎水カラムクロマトグラフィー (ゲル量 350 ml) に供した。本発明の酵素は、ブチルトヨパール 650 M ゲルに吸着し、硫酸 1 M から 0 M のリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約 0.3 M 付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を回収した。再度、この回収液を 1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、セファクリル HR S-200 ゲルを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて精製して、精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を得た。各精製ステップに於ける  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の活性量、比活性及び収率を表 1 に示す。

表 1

工 程	$\alpha$ -イソマルト シル転移酵素活 性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルトシル転 移酵素の比活性 (単位/mg 蛋白)	収 率 (%)
培 養 上 清	26,900	0.41	100
硫酸塩析後の透析液	24,700	1.85	91.8
イオン交換カラム溶出液	19,400	3.41	72.1
アフィニティーカラム溶出液	13,400	18.6	49.8
疎水カラム溶出液	10,000	21.3	37.2
アフィニティーカラム溶出液	6,460	26.9	24.0

7. 5 w / v % 濃度ポリアクリルアミドを含む SDS - ポリアクリル  
アミドゲル電気泳動 (SDS - PAGE) により、本発明の実験で精製  
5 した  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品の純度を検定したところ、本酵素  
標品の蛋白バンドは単一で、純度の高い標品であった。

#### 実験 5 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の性質

実験 4 の方法で得た精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を SDS -  
10 PAGE (ゲル濃度 7. 5 w / v %) に供し、同時に泳動した分子量マ  
ーカー (日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製造) と比較し  
て本酵素標品の分子量を測定したところ、分子量約 112, 000  $\pm$  2  
0, 000 ダルトンであった。

また、前記精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を 2 w / v % アンフ  
15 オライン (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製造) 含有等電点  
ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にかけた後、ゲル中の蛋白バンド及



びゲルの pH を測定して本酵素標品の等電点を求めたところ、その等電点 (pI) は約 5.5 ± 0.5 であった。

本酵素標品の酵素活性に及ぼす温度、pH の影響を活性測定の方法に準じて調べた。結果を図 5 (温度の影響)、図 6 (pH の影響) に示した。本酵素の至適温度は、pH 6.0、30 分間反応で約 45 °C、至適 pH は、35 °C、30 分間反応で約 6.0 であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液 (20 mM 酢酸緩衝液、pH 6.0) を各温度に 60 分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH 安定性は、本酵素を pH の異なる 50 mM 緩衝液中で 4 °C、24 時間保持した後、pH を 6.0 に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。その結果を図 7 (温度安定性) と図 8 (pH 安定性) にそれぞれ示した。これらの図から明らかなように、本酵素の上記の条件下における安定温度域は約 40 °C 以下であり、また、本酵素の上記の条件下における安定 pH 域は pH 約 4.0 乃至約 9.0 であった。

本酵素の活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度 1 mM の各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表 2 に示す。

表 2

金属イオン	相対活性(%)	金属イオン	相対活性(%)
無添加	100	Hg <sup>2+</sup>	1
Zn <sup>2+</sup>	88	Ba <sup>2+</sup>	102
Mg <sup>2+</sup>	98	Sr <sup>2+</sup>	101
Ca <sup>2+</sup>	101	Pb <sup>2+</sup>	89
Co <sup>2+</sup>	103	Fe <sup>2+</sup>	96
Cu <sup>2+</sup>	57	Fe <sup>3+</sup>	105
Ni <sup>2+</sup>	102	Mn <sup>2+</sup>	106
Al <sup>3+</sup>	103	EDTA	104

表2の結果から明らかなように、本酵素活性は、Hg<sup>2+</sup>で著しく阻害され、Cu<sup>2+</sup>でも阻害された。また、Ca<sup>2+</sup>で活性化されず、EDTAで  
5 阻害されないことも判明した。

本酵素のN末端アミノ酸配列を、プロテインシーケンサー『モデル473A』（アプライドバイオシステムズ社製造）を用いて分析したところ、N末端アミノ酸配列として、配列表における配列番号9に示す、イソロイシンーアスパラギン酸ーグリシンーバリンーチロシンーヒスチジンーアラニンープロリンーアスパラギンーグリシンで表されるアミノ酸  
10 配列を有していることが判明した。

#### 実験6 バチルス・グロビスポルスC11からのα-イソマルトシル転移酵素の生産

15 澱粉部分分解物『パインデックス#4』4.0w/v%、酵母抽出物『アサヒミースト』1.8w/v%、リン酸ニカリウム0.1w/v%、リン酸ナトリウム・12水塩0.06w/v%、硫酸マグネシウム・7水塩0.05w/v%及び水からなる液体培地を、500ml容三

角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌し、冷却して、バチルス・グロビスポルスC11 (FERM B P-7144) を接種し、27℃、230rpmで48時間回転振盪培養したもの種培養液とした。

- 5      容量30Lのファーマンターに種培養の場合と同組成の培地を約20L入れて、加熱滅菌、冷却して27℃とした後、種培養液1v/v%を接種し、27℃、pH6.0乃至8.0に保ちつつ、48時間通気攪拌培養した。培養後の培養液中の本酵素活性は約1.8単位/mlであり、遠心分離(10,000rpm、30分間)して回収した上清約18
- 10      Lの本酵素活性は1.7単位/ml(総酵素活性約30,400単位)であった。

#### 実験7      バチルス・グロビスポルスC11からの $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の精製

- 15      実験6で得られた培養上清約18Lを80%飽和硫安液で塩析して4℃、24時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離(10,000rpm、30分間)して回収し10mMリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解後、同緩衝液に対して透析して本酵素活性を28,000単位含む粗酵素液約416mlを得た。この粗酵素液を『セパビーズ (Sepa beads) FP-DA13』ゲル(三菱化学株式会社製造)を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー(ゲル容量1000ml)に供した。
- 20      本酵素は、セパビーズFP-DA13ゲルに吸着せずに、非吸着画分に溶出した。この酵素液を1M硫安を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に対して透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いた
- 25      アフィニティーカラムクロマトグラフィー(ゲル量500ml)に供し

た。本酵素は、セファクリルHR S-200ゲルに吸着し、硫安1 M  
から0 Mのリニアグラジエントで溶出させたところ、硫安濃度約0.3  
M付近でゲルに吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を回収し  
た。更に、酵素画分を1 M硫安を含む10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）  
5 0）に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『ブチル・ト  
ヨパール（Butyl-Toyoppearl）650 M』ゲルを用いた  
疎水カラムクロマトグラフィー（ゲル量350 ml）に供した。本酵素  
は、ブチル・トヨパール650 Mゲルに吸着し、硫安1 Mから0 Mのリ  
ニアグラジエントで溶出させたところ、硫安濃度約0.3 M付近でゲル  
10 に吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を回収した。再度、こ  
の回収した酵素液を1 M硫安を含む10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）  
に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、セファクリルH  
R S-200ゲルを用いるアフィニティーカラムクロマトグラフィー  
により精製した。この精製の各ステップに於ける $\alpha$ -イソマルトシル転  
15 移酵素の活性量、比活性、収率を表3に示す。

表 3

工 程	$\alpha$ -イソマルト シル転移酵素活 性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルトシル転 移酵素の比活性 (単位/mg 蛋白)	収 率 (%)
培養上清	30,400	0.45	100
硫酸塩析後の透析液	28,000	1.98	92.1
イオン交換カラム溶出液	21,800	3.56	71.7
アフィニティーカラム溶出液	13,700	21.9	45.1
疎水カラム溶出液	10,300	23.4	33.9
アフィニティーカラム溶出液	5,510	29.6	18.1

7. 5 w / v % 濃度ポリアクリルアミドを含む SDS-PAGE により、精製した  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品の純度を検定したところ、  
5 、本酵素標品の蛋白バンドは単一で、純度の高い標品であった。

#### 実験 8 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の性質

実験 7 の方法で得た精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を SDS-  
ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (ゲル濃度 7. 5 w / v %) に供し  
10 、同時に泳動した分子量マーカー (日本バイオ・ラッド・ラボラトリー  
株式会社製) と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約  
102,000  $\pm$  20,000 ダルトンであった。

本精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を 2 w / v % 『アンフォライン』  
(アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製造) 含有等電点ポリ  
15 アクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンド及びゲルの  
pH を測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点 (pI) は約 5

． 6 ± 0 . 5 であった。

- 本酵素の酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定の方法に準じて調べた。その結果を図9（温度の影響）、図10（pHの影響）に示した。本酵素の至適温度は、pH 6 . 0、30分間反応で約50℃、至
- 5 適pHは、35℃、30分間反応で約5 . 5乃至6 . 0であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液（20mM酢酸緩衝液、pH 6 . 0）を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素をpHの異なる50mM緩衝液中で、4℃、24時間保持した後、pHを6 . 0に調整し、残存す
- 10 る酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図11（温度安定性）、図12（pH安定性）に示した。これらの図に示されたとおり、本酵素の上記の条件下における安定温度域は約40℃以下であり、また、本酵素の上記の条件下における安定pH域はpH約4 . 5乃至約9 . 0であった。
- 15 本酵素の活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度1mMの各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表4に示す。

表 4

金 属 イ オ ン	相 対 活 性 ( % )	金 属 イ オ ン	相 対 活 性 ( % )
無 添 加	1 0 0	H g <sup>2+</sup>	2
Z n <sup>2+</sup>	8 3	B a <sup>2+</sup>	9 0
M g <sup>2+</sup>	9 1	S r <sup>2+</sup>	9 3
C a <sup>2+</sup>	9 1	P b <sup>2+</sup>	7 4
C o <sup>2+</sup>	8 9	F e <sup>2+</sup>	1 0 4
C u <sup>2+</sup>	5 6	F e <sup>3+</sup>	8 8
N i <sup>2+</sup>	8 9	M n <sup>2+</sup>	9 3
A l <sup>3+</sup>	8 9	E D T A	9 8

表 4 の結果から明らかなように、本酵素活性は、H g <sup>2+</sup>で著しく阻害され、C u <sup>2+</sup>でも阻害された。また、C a <sup>2+</sup>で活性化されないことも、E D T Aで阻害されないことも判明した。

本酵素の N 末端アミノ酸配列を、プロテインシーケンサー『モデル 4 7 3 A』（アプライドバイオシステムズ社製造）を用いて分析した。本酵素は、N 末端アミノ酸配列として、配列表における配列番号 1 0 に示す、イソロイシンーアスパラギン酸ーグリシンーバリンーチロシンーヒスチジンーアラニンープロリンーチロシンーグリシンで表されるアミノ酸配列を有することが判った。

実験 9      αーイソマルトシル転移酵素の内部部分アミノ酸配列

実験 8 の方法で得られた精製酵素標品の一部を 1 0 m M トリスー塩酸緩衝液（p H 9 . 0）に対して、透析した後、同緩衝液で約 1 m g ／ m l の濃度になるように希釈した。この試料液（1 m l）に 1 0 μ g のリジルエンドペプチダーゼ（和光純薬株式会社販売）を加え、3 0 ℃、2 2 時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離



5 するため、逆相 H P L C を行なった。『マイクロボンドバック C 1 8 カラム』（直径 2 . 1 m m × 長さ 1 5 0 m m 、ウオーターズ社製）を用い、流速 0 . 9 m l / 分、室温で 0 . 1 % トリフルオロ酢酸 - 8 % アセトニトリル溶液から 0 . 1 % トリフルオロ酢酸 - 4 0 % アセトニトリル溶
 10 液の 1 2 0 分間のリニアグラジエントの条件で行なった。カラムから溶出したペプチドは、波長 2 1 0 n m の吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離した 3 ペプチド [ P 2 2 （保持時間約 2 2 分）、P 6 3 （保持時間約 6 3 分）、P 7 1 （保持時間約 7 1 分）] を分取し、それぞれ真空乾燥した後、2 0 0  $\mu$  l の 0 . 1 % トリフルオロ酢酸 - 5 0 % アセトニトリル溶液に溶解した。これらのペプチド試料
 15 をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ 8 残基までアミノ酸配列を分析したところ、配列表における配列番号 2 乃至 4 に示すアミノ酸配列が得られた。得られた内部部分アミノ酸配列を表 5 に示す。

15 表 5

ペプチド名	内 部 部 分 ア ミ ノ 酸 配 列
P 2 2	グリシン-アスパラギン-グルタミン酸-メチオニン-アルギニン-アスパラギン- グルタミン-チロシン（配列表における配列番号 2）
P 6 3	イソロイシン-スレオニン-スレオニン-トリプトファン-プロリン-イソロイシン- グルタミン酸-セリン（配列表における配列番号 3）
P 7 1	トリプトファン-アラニン-フェニルアラニン-グリシン-ロイシン-トリプトファン- メチオニン-セリン（配列表における配列番号 4）

実験 1 0      バチルス・グロビスポルス N 7 5 からの  $\alpha$ -イソマルトシ  
 ル転移酵素の生産

20      澱粉部分分解物『パインデックス # 4』4 . 0 w / v %、酵母抽出物

『アサヒミースト』 1. 8 w / v %、リン酸ニカリウム 0. 1 w / v %、リン酸一ナトリウム・12水塩 0. 06 w / v %、硫酸マグネシウム・7水塩 0. 05 w / v % 及び水からなる液体培地を、500 ml 容三角フラスコに 100 ml ずつ入れ、オートクレーブで 121 °C、20 分  
5 間滅菌し、冷却して、バチルス・グロビスポルス N75 (FERM B P-7591) を接種し、27 °C、230 rpm で 48 時間回転振盪培養したものゝ種培養液とした。

容量 30 L のファーメンターに種培養の場合と同組成の培地を約 20 L 入れて、加熱滅菌、冷却して 27 °C とした後、種培養液 1 v / v % を  
10 接種し、27 °C、pH 6. 0 乃至 8. 0 に保ちつつ、48 時間通気攪拌培養した。培養後の培養液中の本酵素活性は約 1. 1 単位 / ml であり、遠心分離 (10, 000 rpm、30 分間) して回収した上清約 18 L の本酵素活性は 1. 1 単位 / ml (総酵素活性約 19, 800 単位) であった。

15

#### 実験 11 バチルス・グロビスポルス N75 からの $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の精製

実験 10 で得られた培養上清約 18 L を 60 % 飽和硫安液で塩析して 4 °C、24 時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離 (10, 000  
20 rpm、30 分間) して回収し 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8. 3) に溶解後、同緩衝液に対して透析して本酵素活性を 15, 700 単位含む粗酵素液約 450 ml を得た。この粗酵素液を『セパビーズ (Sepabeads) FP-DA13』ゲルを用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー (ゲル容量 1000 ml) に供した。本酵素は、セパ  
25 ビーズ FP-DA13 ゲルに吸着せずに、非吸着画分に溶出した。この酵素液を 1 M 硫安を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7. 0) に対して

透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィー (ゲル量 500 ml) に供した。本酵素は、セファクリル HR S-200 ゲルに吸着し、硫安 1 M から 0 M のリニアグラジエントで溶出させたところ、硫安濃度約 0.3 M 付近でゲルに吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を回収した。更に、酵素画分を 1 M 硫安を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『ブチル・トヨパール (Butyl-Toyoparl) 650 M』ゲルを用いた疎水カラムクロマトグラフィー (ゲル量 380 ml) に供した。本酵素は、ブチル・トヨパール 650 M ゲルに吸着し、硫安 1 M から 0 M のリニアグラジエントで溶出させたところ、硫安濃度約 0.3 M 付近でゲルに吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を回収した。この回収した酵素液を 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『スーパーQ-トヨパール (Super Q-Toyoparl) 650 C』ゲルを用いたイオン交換カラムクロマトグラフィー (ゲル量 380 mL) に供した。本酵素は、スーパーQ-トヨパール 650 C ゲルに吸着せずに、非吸着画分に溶出し、得られた溶出画分を回収して、精製標品とした。この精製の各ステップに於ける  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の活性量、比活性、収率を表 6 に示す。

表 6

工 程	$\alpha$ -イソマルトシル 転移酵素活性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルトシル 転移酵素の比活性 (単位/mg 蛋白)	収 率 (%)
培養上清	19,000	0.33	100
硫酸塩析後の透析液	15,700	0.64	82.6
イオン交換カラム溶出液	12,400	3.56	65.3
アフィニティーカラム溶出液	8,320	11.7	43.8
疎水カラム溶出液	4,830	15.2	25.4
イオン交換カラム溶出液	3,850	22.6	20.3

7. 5w/v%濃度ポリアクリルアミドを含むSDS-PAGEにより、本実験で精製した $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品の純度を検定したところ、本酵素標品の蛋白バンドは単一で、純度の高い標品であった。

#### 実験12 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の性質

実験11の方法で得た精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ゲル濃度7.5w/v%）に供し、同時に泳動した分子量マーカー（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製）と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約112,000 $\pm$ 20,000ダルトンであった。

本精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を2w/v%『アンフォライン』（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製造）含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンド及びゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点（pI）は約7.8 $\pm$ 0.5であった。

本酵素の酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定の方法に準じて調べた。その結果を図13（温度の影響）、図14（pHの影響）に示した。本酵素の至適温度は、pH6.0、30分間反応で約50℃、至適pHは、35℃、30分間反応で約6.0であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液（20mM酢酸緩衝液、pH6.0）を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素をpHの異なる50mM緩衝液中で、4℃、24時間保持した後、pHを6.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図15（温度安定性）、図16（pH安定性）に示した。これらの図に示されるとおり、本酵素の上記の条件下における安定温度域は約45℃以下であり、また、本酵素の上記の条件下における安定pH域はpH約4.5乃至約10.0であった。

本酵素の活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度1mMの各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表7に示す。

表 7

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	Hg <sup>2+</sup>	0.5
Zn <sup>2+</sup>	75	Ba <sup>2+</sup>	102
Mg <sup>2+</sup>	95	Sr <sup>2+</sup>	91
Ca <sup>2+</sup>	100	Pb <sup>2+</sup>	69
Co <sup>2+</sup>	92	Fe <sup>2+</sup>	97
Cu <sup>2+</sup>	15	Fe <sup>3+</sup>	90
Ni <sup>2+</sup>	91	Mn <sup>2+</sup>	101
Al <sup>3+</sup>	94	EDTA	92

表7の結果から明らかなように、本酵素活性は、Hg<sup>2+</sup>で著しく阻害され、Cu<sup>2+</sup>でも阻害された。また、Ca<sup>2+</sup>で活性化されないことも、EDTAで阻害されないことも判明した。

本酵素のN末端アミノ酸配列を、プロテインシーケンサー『モデル473A』（アプライドバイオシステムズ社製造）を用いて分析した。本酵素のN末端アミノ酸配列はイソロイシンーアスパラギン酸ーグリシンーバリンーチロシンーヒスチジンーアラニンープロリンーチロシンーグリシンであり、実験8で明らかにした、バチルス・グロビスポルスC11由来の該酵素のN末端アミノ酸配列（配列表における配列番号10）と一致することが判明した。

上記のN末端アミノ酸配列の分析結果と、実験5及び実験8にそれぞれ示したしたバチルス・グロビスポルスC9及びC11由来の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素のN末端アミノ酸配列の分析結果を総合すると、バチルス・グロビスポルスに属する微生物由来の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、N末端アミノ酸配列として、通常、配列表における配列番号1

に示すアミノ酸配列を有すると考えられた。

### 実験 1 3      $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の内部部分アミノ酸配列

実験 1 1 の方法で得られた精製酵素標品の一部を 10 mM トリス-塩  
5 酸緩衝液 (pH 9.0) に対して透析した後、同緩衝液で約 1 mg / ml  
の濃度になるように希釈した。この試料液 (1 ml) に 10  $\mu$ g のリ  
ジルエンドペプチダーゼ (和光純薬株式会社販売) を加え、30 °C、2  
2 時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離  
するため、逆相 HPLC を行なった。『マイクロボンドパック C18 カ  
10 ラム』 (直径 2.1 mm  $\times$  長さ 150 mm、ウォーターズ社製) を用い  
、流速 0.9 ml / 分、室温で 0.1 % トリフルオロ酢酸 - 4 % アセト  
ニトリル溶液から 0.1 % トリフルオロ酢酸 - 42.4 % アセトニトリ  
ル溶液の 120 分間のリニアグラジエントの条件で行なった。カラムか  
ら溶出したペプチドは、波長 210 nm の吸光度を測定することにより  
15 検出した。他のペプチドとよく分離した 3 ペプチド [PN 21 (保持時  
間約 21 分)、PN 38 (保持時間約 38 分)、PN 69 (保持時間約  
69 分)] を分取し、それぞれ真空乾燥した後、200  $\mu$ l の 0.1 %  
トリフルオロ酢酸 - 50 % アセトニトリル溶液に溶解した。これらのペ  
プチド試料をプロテインシーケンサーに供し、6 残基又は 8 残基までア  
20 ミノ酸配列を分析したところ、配列表における配列番号 5 乃至 7 に示す  
アミノ酸配列が得られた。得られた内部部分アミノ酸配列を表 8 に示す  
。

表 8



ペプチド名	内部部分アミノ酸配列
PN 2 1	アスパラギン-トリプトファン-トリプトファン-メチオニン-セリン-リジン (配列表における配列番号5)
PN 3 8	スレオニン-アスパラギン酸-グリシン-グリシン-グルタミン酸-メチオニン-バリン-トリプトファン (配列表における配列番号6)
PN 6 9	アスパラギン-イソロイシン-チロシン-ロイシン-プロリン-グルタミン-グリシン-アスパラギン酸 (配列表における配列番号7)

#### 実験 1 4 アルスロバクター・ラモサス S 1 からの $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の生産

5 澱粉部分分解物『パインデックス # 4』4. 0 w / v %、酵母抽出物『アサヒミースト』1. 8 w / v %、リン酸ニカリウム 0. 1 w / v %、リン酸ナトリウム・12 水塩 0. 06 w / v %、硫酸マグネシウム・7 水塩 0. 05 w / v % 及び水からなる液体培地を、500 ml 容三角フラスコに 100 ml ずつ入れ、オートクレーブで 121 °C、20 分  
10 間滅菌し、冷却して、アルスロバクター・ラモサス S 1 (FERM B P-7592) を接種し、27 °C、230 rpm で 48 時間回転振盪培養したもの種培養液とした。

容量 30 L のファーマンターに種培養の場合と同組成の培地を約 20 L 入れて、加熱滅菌、冷却して 27 °C とした後、種培養液 1 v / v % を  
15 接種し、27 °C、pH 6. 0 乃至 8. 0 に保ちつつ、48 時間通気攪拌培養した。培養後の培養液中の本酵素活性は約 0. 45 単位 / ml であり、遠心分離 (10, 000 rpm、30 分間) して回収した上清約 18 L の本酵素活性は 0. 44 単位 / ml (総酵素活性約 7, 920 単位) であった。

実験 1 5      アルスロバクター・ラモサス S 1 からの  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の精製

実験 1 4 で得られた培養上清約 1 8 L を 8 0 % 飽和硫安液で塩析して 4 °C、2 4 時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離（1 0, 0 0 0  
5 r p m、3 0 分間）して回収し 1 0 m M リン酸緩衝液（p H 7 . 0）に溶解後、同緩衝液に対して透析して、本酵素活性を 6, 0 0 0 単位含む粗酵素液約 3 8 0 m l を得た。この粗酵素液を、1 M 硫安を含む 1 0 m M リン酸緩衝液（p H 7 . 0）に透析し、その透析液を、遠心分離して不溶物を除いた後、『セファクリル（S e p h a c r y l）H R S -  
10 2 0 0』ゲルを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィー（ゲル量 5 0 0 m l）に供した。本酵素は、セファクリル H R S - 2 0 0 ゲルに吸着し、硫安 1 M から 0 M のリニアグラジエント及び、これに続いてマルトテトラオース 0 w / v % から 5 w / v % のリニアグラジエントで溶出させたところ、マルトテトラオース濃度約 2 w / v % 付近で吸着  
15 した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を回収した。更に、酵素画分を 1 M 硫安を含む 1 0 m M リン酸緩衝液（p H 7 . 0）に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『ブチル・トヨパール（B u t y l - T o y o p e a r l）6 5 0 M』ゲルを用いた疎水カラムクロマトグラフィー（ゲル量 3 8 0 m l）に供した。本酵素は、ブチル・トヨパール 6 5 0 M ゲルに吸着し、硫安 1 M から 0 M のリニアグラジエントで溶出させたところ、硫安濃度約 0 . 3 M 付近でゲルに吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を回収して、精製標品とした。この精製の各ステップに於ける  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の活性量、比活性、収率を表 9 に示す。

25

表 9

工 程	$\alpha$ -イソマルトシル 転移酵素活性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルトシル 転移酵素の比活性 (単位/mg 蛋白)	収 率 (%)
培養上清	7, 9 2 0	0. 4 7	1 0 0
硫酸塩析後の透析液	6, 0 0 0	3. 3 6	7 5. 8
アフィニティーカラム溶出液	5, 2 7 0	2 9. 9	6 6. 5
疎水カラム溶出液	4, 4 3 0	3 1. 1	5 5. 9

7. 5 w / v % 濃度ポリアクリルアミドを含む SDS-PAGE により、本実験で精製した  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品の純度を検定したところ、本酵素標品の蛋白バンドは単一で、純度の高い標品であった。

#### 実験 1 6 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の性質

実験 1 5 の方法で得た精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ゲル濃度 7. 5 w / v %）に供し、同時に泳動した分子量マーカー（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製）と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約 1 1 6, 0 0 0  $\pm$  2 0, 0 0 0 ダルトンであった。

本精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を 2 w / v % 『アンフォライン』（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製造）含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンド及びゲルの pH を測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点（pI）は約 4. 2  $\pm$  0. 5 であった。

本酵素の酵素活性に及ぼす温度、pH の影響を活性測定の方法に準じて調べた。その結果を図 1 7（温度の影響）、図 1 8（pH の影響）に

示した。本酵素の至適温度は、 $\text{pH } 6.0$ 、30分間反応で約 $50^\circ\text{C}$ 、  
 至適 $\text{pH}$ は、 $35^\circ\text{C}$ 、30分間反応で約 $6.0$ であった。本酵素の温度  
 安定性は、酵素溶液（ $20\text{ mM}$ 酢酸緩衝液、 $\text{pH } 6.0$ ）を各温度に6  
 0分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求  
 5 めた。また、 $\text{pH}$ 安定性は、本酵素を $\text{pH}$ の異なる $50\text{ mM}$ 緩衝液中で  
 、 $4^\circ\text{C}$ 、24時間保持した後、 $\text{pH}$ を $6.0$ に調整し、残存する酵素活  
 性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図19（温度安定性  
 ）、図20（ $\text{pH}$ 安定性）に示した。これらの図に示されるとおり、本  
 酵素の上記の条件下における安定温度域は約 $45^\circ\text{C}$ 以下であり、また、  
 10 本酵素の上記の条件下における安定 $\text{pH}$ 域は $\text{pH}$ 約 $3.6$ 乃至約 $9.0$   
 であった。

本酵素の活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度 $1\text{ mM}$ の各種金属塩存  
 在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表10に示す。

15 表 1 0

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	$\text{Hg}^{2+}$	0.1
$\text{Zn}^{2+}$	78	$\text{Ba}^{2+}$	97
$\text{Mg}^{2+}$	99	$\text{Sr}^{2+}$	101
$\text{Ca}^{2+}$	103	$\text{Pb}^{2+}$	85
$\text{Co}^{2+}$	91	$\text{Fe}^{2+}$	105
$\text{Cu}^{2+}$	2	$\text{Fe}^{3+}$	75
$\text{Ni}^{2+}$	87	$\text{Mn}^{2+}$	98
$\text{Al}^{3+}$	93	EDTA	91

表 10 の結果から明らかなように、本酵素活性は、 $Hg^{2+}$ で著しく阻害され、 $Cu^{2+}$ でも阻害された。また、 $Ca^{2+}$ で活性化されないことも、EDTAで阻害されないことも判明した。

5 本酵素のN末端アミノ酸配列を、プロテインシーケンサー『モデル 473A』（アプライドバイオシステムズ社製造）を用いて分析した。本酵素のN末端アミノ酸配列は、配列表における配列番号8に示す、アスパラギン酸－スレオニン－ロイシン－セリン－グリシン－バリン－フェニルアラニン－ヒスチジン－グリシン－プロリンで表される配列であることが判明した。

10

実験 17 アルスロバクター・グロビホルミス A19 からの  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の生産

澱粉部分分解物『パインデックス #4』4.0 w/v%、酵母抽出物『アサヒミースト』1.8 w/v%、リン酸ニカリウム0.1 w/v%、  
15 、リン酸ナトリウム・12水塩0.06 w/v%、硫酸マグネシウム・7水塩0.05 w/v%及び水からなる液体培地を、500 ml 容三角フラスコに100 ml ずつ入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌し、冷却して、アルスロバクター・グロビホルミス A19 (FERM BP-7590) を接種し、27℃、230 rpmで48時間回  
20 転振盪培養したものゝ種培養液とした。

容量30 Lのファーマンターに種培養の場合と同組成の培地を約20 L入れて、加熱滅菌、冷却して27℃とした後、種培養液1 v/v%を接種し、27℃、pH 6.0乃至9.0に保ちつつ、48時間通気攪拌培養した。培養後の培養液中の本酵素活性は約1.7単位/mlであり  
25 、遠心分離(10,000 rpm、30分間)して回収した上清約18 Lの本酵素活性は1.6単位/ml(総酵素活性約28,800単位)

であった。

#### 実験 18      アルスロバクター・グロビホルミス A 19 からの $\alpha$ -イソ マルトシル転移酵素の部分精製

5      実験 17 で得られた培養上清約 18 L を 60 % 飽和硫安液で塩析して  
4 °C、24 時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離（10,000  
rpm、30 分間）して回収し 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）に  
溶解後、同緩衝液に対して透析して、本酵素活性を 15,700 単位含  
む粗酵素液約 850 ml を得た。この粗酵素液を、『DEAE-トヨパ  
10      ール（Toyoparl）650S』ゲルを用いたイオン交換カラム  
クロマトグラフィー（ゲル量 380 ml）に供した。本酵素は DEAE  
-トヨパール 650S ゲルに吸着し、NaCl 濃度 0 M から 0.5 M の  
リニアグラジエントで溶出させたところ、NaCl 濃度約 0.3 M 付近  
で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を回収した。更に、酵  
15      素画分を 1 M 硫安を含む 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）に透析し  
、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル（Sepha  
crl）HR S-200』ゲルを用いたアフィニティーカラムク  
ロマトグラフィー（ゲル量 500 mL）に供した。本酵素は、セファク  
リル HR S-200 ゲルに吸着し、硫安 1 M から 0 M のリニアグラジ  
20      エントで溶出させたところ、硫安濃度約 0 M 付近でゲルに吸着した酵素  
が溶出し、本酵素活性を示す画分を回収して、本酵素の部分精製標品を  
得た。この精製の各ステップに於ける  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の活  
性量、比活性、収率を表 11 に示す。

25      表 11

工 程	$\alpha$ -イソマルトシル 転移酵素活性量 (単位)	$\alpha$ -イソマルトシル 転移酵素の比活性 (単位/mg 蛋白)	収 率 (%)
培養上清	28,800	0.18	100
硫酸塩析後の透析液	15,700	0.97	54.5
イオン交換カラム溶出液	7,130	4.01	24.8
アフィニティーカラム溶出液	1,800	11.9	6.3

7. 5w/v%濃度ポリアクリルアミドを含むSDS-PAGEにより、本実験で部分精製した $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品の純度を検  
 5 定したところ、本酵素のものと考えられる主たる蛋白バンドの他に、3  
 種のマイナーな蛋白バンドが認められた。

#### 実験19 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の性質

実験18の方法で得た部分精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品を用  
 10 いて、本酵素の酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定の方法に  
 準じて調べた。その結果を図21（温度の影響）、図22（pHの影響）  
 に示した。本酵素の至適温度は、pH6.0、30分間反応で約50  
 °C、至適pHは、35°C、30分間反応で約6.5であった。本酵素の  
 温度安定性は、酵素溶液（20mM酢酸緩衝液、pH6.0）を各温度  
 15 に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することによ  
 り求めた。また、pH安定性は、本酵素をpHの異なる50mM緩衝液  
 中で、4°C、24時間保持した後、pHを6.0に調整し、残存する酵  
 素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図23（温度安  
 定性）、図24（pH安定性）に示した。これらの図に示されるとおり  
 20 、本酵素の上記の条件下における安定温度域は約45°C以下であり、ま



た、本酵素の上記の条件下における安定 pH 域は pH 約 4.5 乃至約 9.0 であった。

## 実験 20 各種糖質への作用

5 各種糖質を用いて、本酵素の基質になり得るかどうかの試験をした。マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオース、イソマルトース、イソマルトトリオース、パノース、イソマルトシルマルトース、イソパノース、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース、コージビオース、ニゲロース、 $\alpha$ ,  $\beta$ -  
10 トレハロース、セロビオース、ゲンチビオース、マルチトール、マルトトリイトール、ラクトース、スクロース、 $\alpha$ -環状デキストリン、 $\beta$ -環状デキストリン、 $\gamma$ -環状デキストリン、可溶性澱粉、プルラン、又はデキストランの溶液を調製した。これらの溶液に、実験 4 の方法で得たバチルス・グロビスポルス C 9 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品、実験 7 の方法で得たバチルス・グロビスポルス C 11 由来の精  
15 製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品、実験 11 の方法で得たバチルス・グロビスポルス N 75 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品、実験 15 の方法で得たアルスロバクター・ラモサス S 1 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品、及び実験 18 の方法で得たアルスロバクター・グロビホルミス A 19 由来の部分精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素  
20 標品のいずれかを、基質固形物 1 g 当たりそれぞれ 2 単位ずつ加え、基質濃度を 2 w/v % になるように調整し、これを 30 °C、pH 6.0 で 24 時間反応させた。酵素反応前後の反応液を、実験 1 に記載の TLC 法で分析し、それぞれの糖質に対する酵素作用の有無を確認した。結果  
25 を表 12 に示す。

表 1 2

基 質	酵素作用（環状四糖の生成）の有無				
	C9酵素	C11酵素	N75酵素	S1酵素	A19酵素
マルトース	—	—	—	—	—
マルトトリオース	—	—	—	—	—
マルトテトラオース	—	—	—	—	—
マルトペンタオース	—	—	—	—	—
マルトヘキサオース	—	—	—	—	—
マルトヘプタオース	—	—	—	—	—
イソマルトース	—	—	—	—	—
イソマルトトリオース	—	—	—	—	—
パノース	+	+	+	+	+
イソマルトシルマルトース	+	+	+	+	+
イソパノース	—	—	—	—	—
トレハロース（ $\alpha$ , $\alpha$ ）	—	—	—	—	—
コージビオース	—	—	—	—	—
ニゲロース	—	—	—	—	—
ネオトレハロース	—	—	—	—	—
セロビオース	—	—	—	—	—
ゲンチビオース	—	—	—	—	—
マルチトール	—	—	—	—	—
マルトトリイトール	—	—	—	—	—
ラクトース	—	—	—	—	—
スクロース	—	—	—	—	—
$\alpha$ －環状デキストリン	—	—	—	—	—
$\beta$ －環状デキストリン	—	—	—	—	—
$\gamma$ －環状デキストリン	—	—	—	—	—
可溶性澱粉	—	—	—	—	—
プルラン	—	—	—	—	—
デキストラン	—	—	—	—	—

注）「—」は反応前後で基質が変化しなかったことを示し、「+」は反応後に基質の減少とともに環状四糖の生成が認められたことを示している。

表 1 2 の結果から明らかなように、本発明の  $\alpha$ －イソマルトシル転移

酵素は、試験した各種糖質のうち、グルコース重合度が3以上の糖質であって、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合のイソマルトシル基を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するパノース（別名、「イソマルトシルグルコース」）  
5）、イソマルトシルマルトースに作用し、環状四糖を生成することが判明した。これら糖質からの環状四糖の生成率を、実験1の方法に準じてHPLCで測定して得られた糖組成から求めたところ、本実験で用いたいずれも酵素の場合も、パノースからの生成率は約43乃至44%で、イソマルトシルマルトースからの生成率は約31%であった。

10 一方、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有するものの、この非還元末端以外の結合様式として更に $\alpha-1, 6$ グルコシル結合しているイソマルトトリオースには、本発明の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は作用しないことがわかった。なお、高分子グルカンである可溶性澱粉、プルラン、デキストランの場合、上記の試験では、少  
15 なくともTLCで確認できる環状糖質などの低分子糖質は生成しないことが判明した。これら高分子糖質が、本発明の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の作用で還元力を増加せず、加水分解されないことを確認するため、以下の試験を行なった。即ち、可溶性澱粉、プルラン、デキストランの溶液に、実験4の方法で得たバチルス・グロビスポルスC9由来の精製  
20  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品、実験7の方法で得たバチルス・グロビスポルスC11由来の精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品、実験11の方法で得たバチルス・グロビスポルスN75由来の精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品、及び実験15の方法で得たアルスロバクター・ラモサスS1由来の精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品のいずれかを  
25 、基質固形物1g当たりそれぞれ12単位ずつ加え、基質濃度を1w/v%になるように調整し、これを35℃、pH6.0で4時間作用させ

た。この酵素反応による反応液の還元糖量を経時的にソモギー・ネルソン法で測定した。また、同時に反応液の全糖量をアントロン法で測定した。還元力生成率（％）は下記に示す計算式を用いて算出し、それらの結果を表 1 3 にまとめた。

5

### 計算式

$$\text{還元力生成率（％）} = \left[ \frac{\text{反応後の還元糖量}}{\text{反応後の全糖量}} \right] - \left[ \frac{\text{反応前の還元糖量}}{\text{反応前の全糖量}} \right] \times 100$$

表 1 3

酵 素	基 質	還元力生成率（％）			
		0 時間*	1 時間*	2 時間*	4 時間*
C9酵素	可溶性澱粉	0. 0	0. 0	0. 0	0. 0
	プルラン	0. 0	0. 0	0. 0	0. 0
	デキストラン	0. 0	0. 0	0. 1	0. 0
C11酵素	可溶性澱粉	0. 0	0. 1	0. 0	0. 0
	プルラン	0. 0	0. 0	0. 0	0. 0
	デキストラン	0. 0	0. 0	0. 0	0. 0
N75酵素	可溶性澱粉	0. 0	0. 0	0. 0	0. 0
	プルラン	0. 0	0. 0	0. 0	0. 0
	デキストラン	0. 0	0. 0	0. 0	0. 0
S1酵素	可溶性澱粉	0. 0	0. 0	0. 0	0. 0
	プルラン	0. 0	0. 0	0. 0	0. 0
	デキストラン	0. 0	0. 0	0. 0	0. 0

＊，反応開始後の時間を示している。

表 1 3 の結果から明らかなように、可溶性澱粉、プルラン、デキストランいずれも還元力の増加は実質的に見られず、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、これら高分子糖質を実質的に加水分解しないことが判明した。

以上の表 1 2、表 1 3 の結果から明らかなように、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、非還元末端の結合様式として  $\alpha$ -1, 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端の結合様式以外の結合様式として  $\alpha$ -1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が 3 以上の糖質に作用して環状四糖を生成するものと判断される。

#### 実験 2 1 パノースからの生成物

濃度 5 % のパノース水溶液に、実験 4 の方法で得たバチルス・グロビスポルス C 9 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品、実験 7 の方法で得たバチルス・グロビスポルス C 1 1 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品、実験 1 1 の方法で得たバチルス・グロビスポルス N 7 5 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品、実験 1 5 の方法で得たアルスロバクター・ラモサス S 1 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品、及び実験 1 8 の方法で得たアルスロバクター・グロビホルミス A 1 9 由来の部分精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品のいずれかを、基質固形物 1 g 当たり 4 単位加え、30 °C、pH 6. 0 で 1 乃至 1 2 時間作用させた。酵素反応液の糖組成 (%) は、実験 1 に記載の HPLC で分析した。その結果を表 1 4 に示す。

25 表 1 4

酵素	反応時間 (hr)	糖組成 (%)						
		Glc*	Pan*	CTS*	A*	B*	C*	その他
C9酵素	1	5.3	80.4	4.1	4.5	3.3	2.0	0.4
	12	31.9	5.0	43.0	0.0	6.0	2.4	11.7
C11酵素	1	5.2	80.5	4.0	4.6	3.3	1.9	0.5
	12	32.2	4.6	43.5	0.0	5.8	2.3	11.6
N75酵素	1	5.5	80.0	4.2	4.4	3.5	2.0	0.4
	12	31.8	4.4	43.2	0.0	6.5	2.4	11.7
S1酵素	1	5.0	81.1	3.8	4.2	3.8	1.9	0.2
	12	32.5	4.0	43.0	0.0	6.8	2.3	11.4
A19酵素	1	5.2	80.7	4.0	4.3	3.6	1.9	0.3
	12	32.2	4.2	43.1	0.0	6.6	2.3	11.6

\*, Glcはグルコースを、Panはパノースを、CTSは環状四糖をそれぞれ示している。  
A、B、Cはそれぞれ未同定の成分A、B、Cを示している。

表 1 4 の結果から明らかなように、本  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の作用により、基質であるパノース量の減少と共に、グルコースと環状四糖の生成量が顕著に増加した。このことから、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、基質であるパノースにおけるイソマルトシル基と還元末端のグルコースとの間の結合を切断してグルコースを遊離すると共に、イソマルトシル転移を含む反応を触媒することによって、パノースから環状四糖を生成すると考えられた。

また、上記の反応中に生成した他の成分についてみると、反応初期（反応開始後 1 時間）には、3 種類の未同定の成分 A、B、C の生成が認められた。上記の 5 種類の酵素標品による反応液における成分 A 同士、成分 B 同士、成分 C 同士は H P L C における保持時間が互いに一致

し、このことから、上記の 5 種類の反応液中に生成した成分 A 同士、成分 B 同士、成分 C 同士は、それぞれ同一の物質と判断された。これらの 3 種の成分のうち、成分 A は、反応後期（反応開始後 1 2 時間）には消失したが、成分 B 及び C は幾分残存していた。これらのことから、本酵素によるパノースからの環状四糖の生成は、本酵素によるイソマルトシル転移によって生成する成分 A を中間体として経由する一方、成分 B 及び C は本酵素の作用による生成物ではあるけれども環状四糖に変換されにくい中間体であると推察された。

上記の未同定の成分 A、B 及び C を同定するために、分取用 H P L C カラム『Y M C - P a c k O D S - A R 3 5 5 - 1 5 S - 1 5 1 2 A』（株式会社ワイエムシイ製造）を用いて、バチルス・グロビスポルス C 9 由来酵素による上記の反応 1 時間の反応物からそれぞれを単離し、常法に従ってメチル化分析（表 1 5）と<sup>13</sup>C - N M R 分析（表 1 6）を行なった。

表 1 5

メチル化アルジトールアセテートの種類	組成比（モル比）		
	成分 A	成分 B	成分 C
2, 3, 4 - トリメチル化物	2. 0 0	2. 0 0	2. 0 0
2, 3, 6 - トリメチル化物	1. 0 0	2. 1 2	1. 0 0
2, 4, 6 - トリメチル化物	1. 0 3	0. 0 0	0. 0 0
2, 3, 4, 6 - テトラメチル化物	0. 7 4	0. 8 1	1. 7 8

表 1 6



(その1)

グルコース番号	炭素番号	NMR化学シフト値 (ppm)		
		成分 A	成分 B	成分 C
a	1a	100.8	100.8	100.7
	2a	74.3	74.4	74.0
	3a	75.8	75.8	75.8
	4a	72.3	72.2	72.2
	5a	74.5	74.5	74.5
	6a	63.2	63.2	63.2
b	1b	102.5	102.7	102.7
	2b	74.3	74.1	74.2
	3b	75.8	75.8	75.8
	4b	72.6	72.2	71.8
	5b	74.0	74.1	74.2
	6b	67.9	68.6	67.8
c	1c	100.6	100.6	100.7
	2c	72.8	74.2	74.0
	3c	83.1	76.1	75.8
	4c	72.0	80.1	72.2
	5c	73.1	73.0	74.5
	6c	63.0	63.2	63.2
d	1d	102.2	102.7	102.4
	2d	74.3	74.0	74.3
	3d	75.8	75.8	75.8
	4d	72.1	72.1	72.1
	5d	74.3	73.9	74.2
	6d	68.4	69.0	68.5

(続きあり)

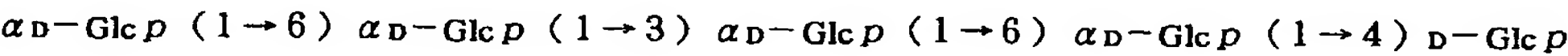
(その2)

グルコース番号	炭素番号	NMR化学シフト値 (ppm)		
		成分 A	成分 B	成分 C
e	1e	94.6 (α)	94.6 (α)	105.3
		98.5 (β)	98.5 (β)	
	2e	74.3 (α)	74.3 (α)	75.7
		76.7 (β)	76.7 (β)	
	3e	75.8 (α)	75.9 (α)	78.5
		78.9 (β)	78.9 (β)	
	4e	80.0 (α)	80.3 (α)	79.4
		79.9 (β)	80.1 (β)	
	5e	72.6 (α)	72.7 (α)	77.4
		77.2 (β)	77.3 (β)	
	6e	63.5 (α)	63.6 (α)	63.2
		63.4 (β)	63.6 (β)	

(以上)

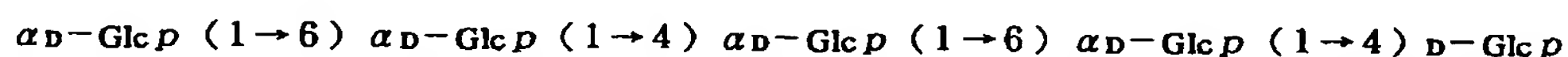
これらの結果から、成分 A は、パノースの非還元末端グルコースの 3 位水酸基にイソマルトシル基が α 結合した 5 糖で、下記に示す化学式 1 で表わされる 3-O-α-イソマルトシルパノースであることが判明し、本発明の α-イソマルトシル転移酵素は、パノースの非還元末端グルコースの 3 位水酸基にイソマルトシル基を転移する作用を有することが判明した。

10 化学式 1 :



また、成分 B は、パノースの非還元末端グルコースの 4 位水酸基にイソマルトシル基が  $\alpha$  結合した 5 糖で、下記に示す化学式 2 で表わされる 4-O- $\alpha$ -イソマルトシルパノースであることが判明し、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、パノースの非還元末端グルコースの 4 位水酸基にイソマルトシル基を転移する作用を有することが判明した。

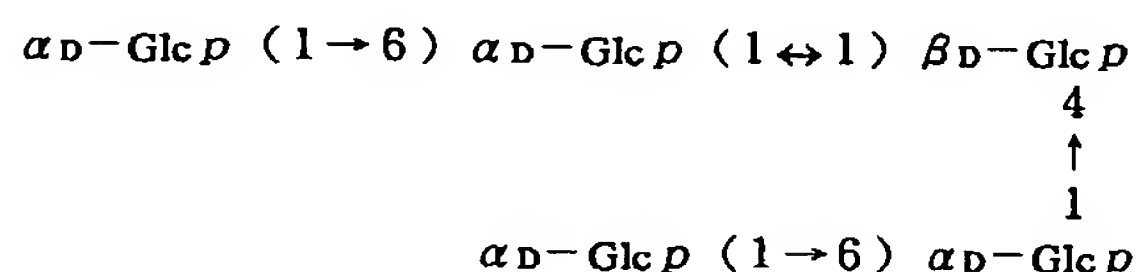
化学式 2 :



10 さらに、成分 C は、パノースの還元末端グルコースの 1 位水酸基にイソマルトシル基が  $\alpha$  結合した 5 糖で、下記に示す化学式 3 で表される 1- $\text{O}-\alpha$ -イソマルトシル  $\beta$ -パノシドであることが判明し、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、パノースの還元末端グルコースの 1 位水酸基にイソマルトシル基を転移する作用を有することが判明した。

15

化学式 3 :



次に、上記で同定された成分 A、B 及び C からの環状四糖の生成を、  
20 精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を用いて以下のようにして調べた。すなわち、成分 A（3-O- $\alpha$ -イソマルトシルパノース、化学式 1）、成分 B（4-O- $\alpha$ -イソマルトシルパノース、化学式 2）及び成分 C

(1-O- $\alpha$ -イソマルトシル  $\beta$ -パノシド、化学式 3) のいずれかの  
 1 w / v % 水溶液 (pH 6.0) を調製し基質溶液とした。これらの基  
 質溶液に、実験 4 の方法で得たバチルス・グロビスポルス C 9 由来の精  
 製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品及び実験 7 の方法で得たバチルス・  
 5 グロビスポルス C 11 由来の精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品のい  
 ずれかを基質固形分 1 g 当たり 1 単位加え、35℃で 8 時間作用させた  
 後、HPLC で反応後の糖組成 (%) を調べた。結果を表 17 に示す。

表 17

酵 素	基 質 <sup>*1</sup>	反応後の糖組成 <sup>*3</sup> (%)			
		基質 <sup>*2</sup>	グルコース	環状四糖	その他
C9酵素	成分A	9.3	17.2 (1.00)	67.6 (1.09)	5.9
	成分B	77.1	0.7	5.1	17.1
	成分C	55.8	0.2	6.0	38.0
C11酵素	成分A	9.0	17.4 (1.00)	67.4 (1.08)	6.2
	成分B	77.0	0.6	5.0	17.4
	成分C	56.0	0.2	5.9	37.9

\*1, 成分 A は 3-O- $\alpha$ -イソマルトシルパノース (化学式 1) を、成分 B は 4-O- $\alpha$ -イソマルトシルパノース (化学式 2) を、成分 C は 1-O- $\alpha$ -イソマルトシル  $\beta$ -パノシド (化学式 3) をそれぞれ意味する。

\*2, 反応後に残存していた基質 (成分 A、B 又は C) の全糖質に対する割合を示している。

\*3, 括弧内にグルコースと環状四糖の生成モル比を示している。

表 17 から明らかなように、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は成分 A によく作用し、この酵素作用によって等モルのグルコースと環状

四糖が生成した。一方、成分 B 及び C に対しては本酵素は比較的作用し  
難く、成分 A を基質とする場合と比べると環状四糖の生成は少なく、ま  
た、 $\alpha$ -イソマルトシル転移によるさらに別の生成物と思われる他のオリ  
ゴ糖の生成も比較的多く認められた。以上のことから、本酵素の作用  
5 によるパノースからの環状四糖の生成反応は、主に成分 A を中間体とし  
て経由し、一部は、成分 B 及び C を中間体として経由しているものと推  
察された。

以上のことから、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素のパノースに  
対する主たる作用は、以下のように判断された。

10 (1) 本発明の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、パノースに作用し  
てイソマルトシル基と還元末端グルコースとの間の  $\alpha$ -1, 4 グルコシ  
ル結合を切断し、分子間の  $\alpha$ -イソマルトシル転移反応によって、イソ  
マルトシル基を、パノースの非還元末端グルコースの 3 位又は 4 位の水  
酸基若しくはパノースの還元末端グルコースの 1 位の水酸基に転移し、  
15 それぞれ、3-O- $\alpha$ -イソマルトシルパノース（上記で同定した成分  
A、化学式 1）、4-O- $\alpha$ -イソマルトシルパノース（上記で同定し  
た成分 B、化学式 2）、及び 1-O- $\alpha$ -イソマルトシル  $\beta$ -パノシド  
（上記で同定した成分 C、化学式 3）を生成する。

(2) 本発明の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は上記の生成物にも作  
20 用し、当該酵素が 3-O- $\alpha$ -イソマルトシルパノースに作用すると、  
この糖質における  $\alpha$ -イソマルトシル-（1 $\rightarrow$ 3）-イソマルトシル基  
と還元末端グルコースとの間の  $\alpha$ -1, 4 グルコシル結合を切断し、分  
子内転移の環化反応によって、 $\alpha$ -イソマルトシル-（1 $\rightarrow$ 3）-イソ  
マルトシル基における還元末端の 1 位の原子をそれ自身の非還元末端グ  
25 ルコースの 3 位の水酸基に転移して環を閉じ、環状糖質である環状四糖  
を生成する。

このように、本発明の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、分子間転移と分子内転移の2つの転移作用を有しており、本酵素の分子間転移は、非還元末端のイソマルトシル基に隣接する $\alpha-1, 4$ グルコシル結合に作用して、そのイソマルトシル基を、他分子の非還元末端グルコースの3位又は4位の水酸基若しくは還元末端グルコースの1位水酸基に転移する分子間イソマルトシル転移作用であること、また、本発明の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の分子内転移は、主として、非還元末端の $\alpha$ -イソマルトシル- $(1 \rightarrow 3)$ -イソマルトシル基に隣接する $\alpha-1, 4$ グルコシル結合に作用し、 $\alpha$ -イソマルトシル- $(1 \rightarrow 3)$ -イソマルトシル基における還元末端をそれ自身の非還元末端グルコースの3位水酸基に分子内転移し、環状糖質である環状四糖を生成する作用であることが判明した。

以上、実験20及び実験21の結果から、本発明の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質に作用して環状四糖を生成するものと判断される。

#### 実験22 転移受容体特異性

各種糖質が本発明の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の転移受容体になり得るかどうかについて、以下の試験を行った。即ち、被験糖質として、D-グルコース、D-キシロース、L-キシロース、D-ガラクトース、D-フラクトース、D-マンノース、D-アラビノース、D-フコース、L-ソルボース、L-ラムノース、メチル- $\alpha$ -D-グルコシド、メチル- $\beta$ -D-グルコシド、N-アセチル-D-グルコサミン、D-リボース、L-リボース、D-ブシコース、ソルビトール、キシリトール

ル、マンニトール、アラビトール、リビトール、エリスリトール、マル  
トース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース  
、イソマルトース、イソマルトトリオース、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース、 $\alpha$   
、 $\beta$ -トレハロース、コージビオース、ニゲロース、セロビオース、ゲ  
5 ンチビオース、イソパノース、マルチトール、マルトトリイトール、ラ  
クトース、スクロース、エルロース、イソマルトシルグルコシド、 $\alpha$ -  
環状デキストリン、 $\beta$ -環状デキストリン、 $\gamma$ -環状デキストリン、及  
びL-アスコルビン酸を用い、これらのいずれかを含む水溶液を調製し  
た。これらの被験糖質の水溶液それぞれに、糖供与体としてパノースを  
10 等濃度になるように加え、さらに、実験4の方法で得たバチルス・グロ  
ビスポルスC9由来の精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品、実験7の  
方法で得たバチルス・グロビスポルスC11由来の精製 $\alpha$ -イソマルト  
シル転移酵素標品、実験11の方法で得たバチルス・グロビスポルスN  
75由来の精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品、実験15の方法で得  
15 たアルスロバクター・ラモサスS1由来の精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移  
酵素標品、及び実験18の方法で得たアルスロバクター・グロビホルミ  
スA19由来の部分精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品のいずれかを  
、糖質固形物1g当たり10単位ずつ加え、糖濃度を3.2w/v%に  
なるように調整した。以上の反応液を30℃、pH6.0で24時間保  
20 持して酵素反応に供した。酵素反応後の反応液を、被験糖質が単糖又は  
二糖の場合はガスクロマトグラフィー法（以下、「GLC法」と略記す  
る。）で、被験糖質が三糖以上の場合はHPLC法で分析し、糖転移物  
が生成したか否かによって、それぞれの被験糖質が本酵素の転移受容体  
となり得るか否かを調べた。なお、GLCでは、GLC装置は株式会社  
25 島津製作所製『GC-16A』、カラムはジー・エル・サイエンス株式  
会社製『2%シリコンOV-17/クロモゾルブW』を充填したステン



レスカラム（3 mm  $\phi$   $\times$  2 m）、キャリアーガスは窒素ガスを流量 40 ml / 分で 160 °C から 320 °C まで 7.5 °C / 分の速度で昇温し、検出は水素炎イオン検出器で分析した。HPLC に於いて、HPLC 装置は東ソー株式会社製『CCPD』、カラムは『ODS-AQ-303』  
5 （株式会社ワイエムシー社製造）、溶離液は水を流速 0.5 ml / 分で、検出は示差屈折計で分析した。結果を表 18 に示す。

表 18

(その1)

被験糖質	転移生成物				
	C9酵素	C11酵素	N75酵素	S1酵素	A19酵素
D-グルコース	++	++	++	++	++
D-キシロース	++	++	++	++	++
L-キシロース	++	++	++	++	++
D-ガラクトース	—	—	—	+	±
D-フラクトース	—	—	—	+	±
D-マンノース	—	—	—	—	—
D-アラビノース	±	±	±	+	±
D-フコース	±	±	±	+	±
L-ソルボース	+	+	+	+	+
L-ラムノース	±	±	±	+	±
メチル- $\alpha$ -グルコシド	++	++	++	++	++
メチル- $\beta$ -グルコシド	++	++	++	+	+
N-アセチルグルコサミン	—	—	—	—	—
D-リボース	—	—	—	+	±
L-リボース	—	—	—	++	±
D-ブシコース	—	—	—	±	±
ソルビトール	—	—	—	±	±
キシリトール	—	—	—	±	±
マンニトール	—	—	—	—	—
アラビトール	—	—	—	±	—
リビトール	—	—	—	±	—
エリスリトール	+	+	+	+	±
マルトース	+	+	+	+	+
マルトトリオース	+	+	+	++	+

(続きあり)

注) 表中、「—」は糖転移物が生成しなかったことを、「±」は糖転移物が全糖質に対して1%未満生成したことを、「+」は糖転移物が全糖質に対して1%以上10%未満生成したことを、「++」は糖転移物が全糖質に対して10%以上生成したことを示している。

(その2)

被験糖質	転移生成物				
	C9酵素	C11酵素	N75酵素	S1酵素	A19酵素
マルトテトラオース	+	+	+	+	+
マルトペンタオース	+	+	+	±	+
イソマルトース	++	++	++	++	++
イソマルトトリオース	+	+	+	++	+
トレハロース ( $\alpha$ , $\alpha$ )	+	+	+	+	+
ネオトレハロース	++	++	++	++	++
コージビオース	+	+	+	+	+
ニゲロース	+	+	+	+	+
セロビオース	+	+	+	+	+
ゲンチビオース	++	++	++	+	+
イソパノース	+	+	+	+	+
マルチトール	+	+	+	+	+
マルトトリイトール	+	+	+	+	+
ラクトース	+	+	+	+	+
スクロース	+	+	+	+	+
エルロース	+	+	+	+	+
イソマルトグルコシド	++	++	++	++	++
$\alpha$ -環状デキストリン	-	-	-	-	-
$\beta$ -環状デキストリン	-	-	-	-	-
$\gamma$ -環状デキストリン	-	-	-	-	-
L-アスコルビン酸	++	++	++	++	+

(以上)

注) 表中、「-」は糖転移物が生成しなかったことを、「±」は糖転移物が全糖質に対して1%未満生成したことを、「+」は糖転移物が全糖質に対して1%以上10%未満生成したことを、「++」は糖転移物が全糖質に対して10%以上生成したことを示している。

表18の結果から明らかなように、本発明の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、転移受容体として種々の糖質が利用できることが判明した。詳

5 細には、バチルス・グロビスポルスに属する微生物であるC9株、C1

1 株及び N 7 5 株由来の当該酵素は、特に、D-グルコース、D-及び  
L-キシロース、メチル- $\alpha$ -グルコシド、メチル- $\beta$ -グルコシド、  
イソマルトース、ネオトレハロース、ゲンチビオース、イソマルトシル  
グルコシド、及びL-アスコルビン酸によく転移し、次いで、L-ソル  
5 ボース、マルトース、トレハロース、コージビオース、ニゲロース、セ  
ロビオース、ラクトース、スクロース、マルトトリオース、イソマルト  
トリオース、イソパノース、エルロース、マルトテトラオース、マルト  
ペンタオース、エリスリトール、マルチトール、マルトトリイトールに  
転移し、さらには、D-アラビノース、D-フコース、L-ラムノース  
10 にも転移することが判明した。アルスロバクター・ラモサス S 1 由来の  
当該酵素は、特に、D-グルコース、D-及びL-キシロース、メチル  
- $\alpha$ -グルコシド、L-リボース、イソマルトース、ネオトレハロース  
、マルトトリオース、イソマルトトリオース、イソマルトシルグルコシ  
ド、L-アスコルビン酸によく転移し、次いで、D-ガラクトース、D  
15 -フラクトース、D-アラビノース、D-フコース、L-ソルボース、  
L-ラムノース、メチル- $\beta$ -グルコシド、D-リボース、マルトース  
、トレハロース、コージビオース、ニゲロース、セロビオース、ゲンチ  
ビオース、ラクトース、スクロース、イソパノース、エルロース、マル  
トテトラオース、エリスリトール、マルチトール、マルトトリイトール  
20 に転移し、さらには、D-プシコース、マルトペンタオース、ソルビト  
ール、キシリトール、アラビトール、リビトールにも転移することが判  
明した。アルスロバクター・グロビホルミス A 1 9 由来の当該酵素は、  
特に、D-グルコース、D-及びL-キシロース、メチル- $\alpha$ -グルコ  
シド、イソマルトース、ネオトレハロース、イソマルトシルグルコシド  
25 によく転移し、次いで、L-ソルボース、メチル- $\beta$ -グルコシド、マ  
ルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオー

ス、イソマルトトリオース、トレハロース、コージビオース、ニゲロース、セロビオース、ゲンチビオース、イソパノース、マルチトール、マルトトリイトール、ラクトース、スクロース、エルロース、L-アスコルビン酸に転移し、さらには、D-ガラクトース、D-フラクトース、  
 5 D-アラビノース、D-フコース、L-ラムノース、D-リボース、L-リボース、D-プシコース、ソルビトール、キシリトール、エリスリトールにも転移することが判明した。

以上述べた本発明の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の性質のうち、精製標品について得られたものを、先にアルテルナンから環状四糖の生成が  
 10 報告されている『ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー』、第226巻、633乃至639頁（1994年）記載の加水分解酵素アルテルナナーゼの場合と比較した。その結果を表19にまとめた。

15 表 1 9

性 質	$\alpha$ -イソマルトシル転移酵素				アルテルナナーゼ
	C9酵素	C11酵素	N75酵素	S1酵素	
酵素の種類	転移酵素	転移酵素	転移酵素	転移酵素	加水分解酵素
等電点 (pI)	5.5 $\pm$ 0.5	5.6 $\pm$ 0.5	7.8 $\pm$ 0.5	4.2 $\pm$ 0.5	約4
反応最適pH	約6.0	約5.5乃至6.0	約6.0	約6.0	約7
Ca <sup>2+</sup> による活性化	なし	なし	なし	なし	あり
Fe <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , EDTAによる阻害	なし	なし	なし	なし	あり
可溶性澱粉, プルランの加水分解	しない	しない	しない	しない	弱くする

表 1 9 から明らかなとおり、本発明の  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素は、アルテルナナーゼとは全く異なる性質を有する新規な酵素であるといえる。

5

### 実験 2 3 環状四糖の調製

パノース（株式会社林原生物化学研究所製造）の水溶液（約 1 0 0 L）を濃度 4 w / v %、p H 6 . 0、温度 3 0 °C に調整した後、実験 7 の方法で得た本発明の精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素標品をパノース 1 g 当たり 2 単位加え、4 8 時間作用させた後、1 0 0 °C で 1 0 分間熱処理して酵素を失活させた。この反応液の一部を採り、H P L C で環状四糖生成量を調べたところ、糖組成として約 4 4 % であった。この反応液を p H 5 . 0、温度 4 5 °C に調整した後、実験 1 と同様に  $\alpha$ -グルコシダーゼ処理（固形物 1 g 当たり 1 5 0 0 単位を添加）とナガセ生化学工業社製グルコアミラーゼ剤（グルコチーム）処理（固形物 1 g 当たり 7 5 単位を添加）を 2 4 時間行い、残存する還元性オリゴ糖などを加水分解し、更に、水酸化ナトリウムで p H 5 . 8 に調整し 9 0 °C で 1 時間保持して酵素を失活させ、不溶物を濾過して除去した。この濾液を逆浸透膜を用いて固形分濃度約 1 6 % まで濃縮した後、常法に従って脱色、脱塩、濾過、濃縮したところ、固形分約 3 6 5 0 g を含む糖液約 6 . 1 k g を得た。得られた糖液を、オルガノ製イオン交換樹脂（アンバーライト C R - 1 3 1 0、N a 型）を充填したカラム（ゲル量約 2 2 5 L）に供し、カラム内温度 6 0 °C で流速約 4 5 L / h の条件でクロマト分離を行なった。溶出液の糖組成を実験 1 に記載の H P L C 法でモニターし、環状四糖の純度が 9 8 % 以上の画分を回収し、常法に従って脱色、脱塩、濾過、濃縮したところ、固形分約 1 0 0 0 g を含む糖液約 3 k g を得

10

15

20

25

た。得られた糖液の糖組成をHPLC法で測定したところ、環状四糖の純度は約99.2%であった。

#### 実験24 水溶液からの結晶化

5 実験23の方法で得た環状四糖水溶液をエバポレーターで濃度約50%に濃縮した後、得られた濃縮糖液約2kgを円筒状のプラスチック容器に入れ、緩やかに回転させながら約20時間で温度を65℃から20℃まで下げて晶析させ、乾燥して、白色の結晶状粉末を得た。その顕微鏡写真を図25に示す。続いて、遠心濾過器を用いて分蜜して、結晶状  
10 物を湿重量で542g回収した。更に、60℃で3時間乾燥して環状四糖結晶状粉末を456g得た。得られた結晶状粉末の糖組成をHPLC法で測定したところ、環状四糖の純度は99.9%以上で、極めて高純度であった。

この環状四糖の結晶状粉末を粉末X線回折法で解析したところ、図2  
15 6に示すように、主な回折角(2θ)として、10.1°、15.2°、20.3°及び25.5°を有することを特徴とする回折スペクトルが得られた。また、この結晶状粉末の水分をカール・フィッシャー法で測定したところ、その水分は13.0%であること、また、環状四糖1分子当たり5乃至6分子の水を含む結晶であることが判明した。

20 更に、この環状四糖の結晶粉末を熱重量測定したところ、図27に示す熱重量曲線が得られ、その重量変化と温度との関係から、150℃まで温度を上昇させたとき、4乃至5分子の水に相当する重量減少が認められ、続いて、250℃付近で1分子の水に相当する重量減少が認められ、更に、280℃付近から環状四糖自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。これらのことから、本発明の環状四糖5乃至6含水結  
25 晶は、常圧において、温度を150℃まで上昇させることにより結晶分



子当たり 4 乃至 5 分子の水が離脱して 1 分子の水を含む結晶になり、更に 250℃ 付近で 1 分子の水が結晶から離脱して無水結晶になることが判明した。

#### 5 実験 2 5 環状四糖 1 含水結晶への変換

実験 2 4 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末をガラス容器に入れ、予め温度 140℃ に保温したオイルバス中にそのガラス容器を 30 分間保持した。得られた環状四糖粉末を粉末 X 線回折法で解析したところ、熱処理前の 5 乃至 6 含水結晶の粉末 X 線回折とは全く異なり、図 2 8 に示すように、主な回折角 ( $2\theta$ ) として、8.3°、16.6°、17.0° 及び 18.2° を有することを特徴とする回折スペクトルが得られた。また、この結晶状粉末の水分をカール・フィッシャー法で測定したところ、その水分は約 2.7% で、環状四糖 1 分子当たり 1 分子の結晶水を含むことが判明した。更に、この結晶粉末を熱重量測定したところ、図 2 9 に示す熱重量曲線が得られ、その重量変化と温度との関係から、温度 270℃ 付近で 1 分子の水に相当する重量減少が認められ、更に、温度 290℃ 付近から環状四糖自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。これらのことから、本実験例で得た環状四糖結晶状物は 1 含水結晶であることが判明した。

20

#### 実験 2 6 無水結晶への変換

実験 2 4 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末を温度 40℃ 又は 120℃ でそれぞれ 16 時間真空乾燥した。得られた環状四糖粉末の水分をカール・フィッシャー法で測定したところ、真空乾燥温度 40℃ の場合は水分が約 4.2% であり、真空乾燥温度 120℃ の場合は水分が約 0.2% で、実質的に無水であることが判明した。これら真空乾燥

25

した環状四糖粉末を粉末 X 線回折法で解析したところ、真空乾燥前の 5 乃至 6 含水結晶の粉末 X 線回折及び 1 含水結晶のものとは全く異なり、図 3 0（真空乾燥温度 4 0 °C）、図 3 1（真空乾燥温度 1 2 0 °C）に示すように、主な回折角（ $2\theta$ ）として、1 0 . 8 °、1 4 . 7 °、1 5 . 0 °、1 5 . 7 ° 及び 2 1 . 5 ° を有することを特徴とする回折スペクトルが得られた。両回折スペクトル間のピーク強度に強弱が認められるものの、基本的にピークの回折角（ $2\theta$ ）は同一で、結晶学的に同一の無水結晶であると判断された。また、回折スペクトルのベースラインは山状を呈し、真空乾燥前の環状四糖 5 乃至 6 含水結晶のもの、及び 1 含水結晶のものとは比べ結晶化度が低下しており、非結晶状態（アモルファス）の環状四糖が存在していることが判明した。このことから、真空乾燥 4 0 °C の場合の水分を約 4 . 2 % 含む環状四糖粉末は、その水分を含む環状四糖アモルファスと、環状四糖無水結晶とが混在する粉末であると推察された。

15 以上のことから、環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末を真空乾燥することにより、環状四糖 5 乃至 6 含水結晶は水分子を失い、非結晶状態のアモルファスと無水結晶に変換することが判明した。なお、水分 0 . 2 % の無水環状四糖粉末について、実験 2 4 と同様に熱重量分析したところ、図 3 2 に示すように、温度 2 7 0 °C 付近から環状四糖の熱分解と考えられる重量減少のみが観察された。

#### 実験 2 7 水に対する飽和濃度

温度 1 0 乃至 9 0 °C での水に対する環状四糖の飽和濃度を調べるため、密栓付きガラス製容器に水 1 0 m l を入れ、それに実験 2 4 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を、各温度で完全に溶解する量以上の量を加えた後、ガラス容器を密封し、飽和に達するまで温度 1 0 乃至 9 0

℃で保温しながら2日間攪拌した。それぞれの温度の環状四糖飽和溶液を精密濾過して未溶解の環状四糖を除去した後、その濾液の水分を乾燥減量法（120℃で真空乾燥）で調べ、各温度での飽和濃度（無水物換算）を求めた。結果を表20に示す。

5

表 2 0

温度（℃）	環状四糖の飽和濃度（％）	水100gに溶解する環状四糖の重量（g）
10	30.3	43.5
30	34.2	51.9
50	42.6	74.2
70	53.0	112.7
90	70.5	239.0

実験 2 8      熱安定性

10      実験 2 4 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を水に溶解し濃度 10 w / v % の環状四糖水溶液を調製し、その溶液 8 m l をガラス製試験管に採り、密封した後、120℃で30乃至90分間加熱した。放冷後、それら溶液の着色度の測定と、実験 1 記載の液体クロマトグラフィー  
15      法による純度測定を行った。着色度は、480nmにおける1cmセルでの吸光度とした。結果を表21に示す。

表 2 1

加 熱 時 間 (分)	着色度 ( $A_{480nm}$ )	純 度 (%)
0	0. 0 0	1 0 0
3 0	0. 0 0	1 0 0
6 0	0. 0 0	1 0 0
9 0	0. 0 0	1 0 0

表 2 1 の結果から明らかなように、環状四糖水溶液は 1 2 0 °C の高温加熱でも着色はなく、糖組成の純度の低下もなく、環状四糖は熱に対して安定な糖質であることが判明した。

#### 実験 2 9      pH 安定性

実験 2 4 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を各種緩衝液 (2 0 m M) に溶解し、環状四糖を濃度 4 w / v %、p H 2 乃至 1 0 に調整した環状四糖溶液を調製した。それぞれの溶液 8 m l をガラス製試験管に採り、密封した後、1 0 0 °C で 2 4 時間加熱した。放冷後、それら溶液の着色度の測定と、実験 1 に記載の液体クロマトグラフィー法による純度測定を行った。着色度は、4 8 0 n m における 1 c m セルでの吸光度とした。結果を表 2 2 に示す。

表 2 2

pH (緩衝液の種類)	着色度 ( $A_{480nm}$ )	純度 (%)
2.0 (酢酸)	0.00	93
3.0 (酢酸)	0.00	100
4.0 (酢酸)	0.00	100
5.0 (酢酸)	0.00	100
6.0 (トリス-塩酸)	0.00	100
7.0 (トリス-塩酸)	0.00	100
8.0 (トリス-塩酸)	0.00	100
9.0 (アンモニウム)	0.00	100
10.0 (アンモニウム)	0.00	100

表 2 2 の結果から明らかなように、環状四糖は 120℃ の高温で 24 時間加熱しても、pH 2 乃至 10 の広範囲で着色はなく、pH 2 において糖組成の純度は僅か低下するものの、pH 3 乃至 10 の範囲では全く糖組成の純度は低下せず、環状四糖は広い pH 範囲で換言すれば、pH 3 乃至 5 の酸性側、pH 6 乃至 8 の中性側、pH 9 乃至 10 のアルカリ側で煮沸しても極めて安定な糖質であることが判明した。

#### 10 実験 30 アミノカルボニル反応

実験 2 4 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を水に溶解し、更に、それに市販試薬特級のグリシンとリン酸緩衝液を加え、50 mM リン酸緩衝液で pH 7.0 に調整した 1 w / v % グリシンを含む 10 w / v % 環状四糖溶液を調製した。その溶液 4 ml をガラス製試験管に採り、密封した後、100℃ で 30 乃至 90 分間加熱した。室内で放冷後、それらの着色度を測定しアミノカルボニル反応性を調べた。着色度は、480 nm における 1 cm セルでの吸光度とした。結果を表 2 3 に示す。

表 2 3

加熱時間 (分)	着色度 ( $A_{480nm}$ )
0	0. 0 0
3 0	0. 0 0
6 0	0. 0 0
9 0	0. 0 0

- 5 表 2 3 の結果から明らかなように、環状四糖は、グリシン共存下で加熱しても着色はなく、グリシンとの褐変を引き起こさない、換言すればアミノカルボニル反応（メイラード反応とも言う）を起こしにくい安定な糖質であることが判明した。

#### 10 実験 3 1 アミノカルボニル反応

- 実験 2 4 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶と市販ポリペプトン（日本製薬製）とを脱イオン水に溶かし、5 w / v % ポリペプトンを含む 1 0 w / v % 環状四糖溶液を調製した。その溶液 4 m l をガラス製試験管に採り、密封した後、1 2 0 °C で 3 0 乃至 9 0 分間加熱した。室内  
15 で放冷後、それらの着色度を測定しアミノカルボニル反応性を調べた。同時に、ポリペプトンのみを含む溶液をブランクとして同様に加熱した。着色度は、4 8 0 n m における 1 c m セルでの吸光度とし、ブランクの吸光度を差し引いた値とした。結果を表 2 4 に示す。

#### 20 表 2 4

加熱時間 (分)	着色度 ( $A_{480nm}$ )
0	0.00
30	0.00
60	0.00
90	0.00

表 2 4 の結果から明らかなように、環状四糖は、ポリペプトン共存下  
 で加熱して、ポリペプトンとの褐変を引き起こさない、換言すれば、ア  
 ミノカルボニル反応を起こしにくい安定な糖質であることが判明した。

### 実験 3 2 包接作用

実験 2 4 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を脱イオン水に溶か  
 し、20%水溶液を調製した。その水溶液 100 g 当たり、メタノール  
 は 2 g、エタノールは 3 g、酢酸は 4.6 g を加えて包接を行なった。  
 その後、それぞれを濾過し濾液を凍結乾燥し、未包接物を除去した。対  
 照として、包接能を有することが知られている分枝サクロデキストリン  
 (商品名『イソエリート P』、マルハ株式会社販売) を用いて同様に行  
 なった。

凍結乾燥粉末中の包接物量を測定するために、それぞれの凍結乾燥粉  
 末 1 g を 5 ml の脱イオン水に溶かし、それに 5 ml のジエチルエーテ  
 ルを加えて抽出を行ない、再度、抽出を繰り返した後、ジエチルエーテ  
 ル中の抽出物をガスクロマトグラフィー法で定量した。結果を表 2 5 に  
 示す。



表 2 5

包 接 物	包接量 (mg / g - 凍結乾燥粉末)	
	環状四糖	イソエリート P (対照)
メ タ ノ ー ル	6. 7 1	2. 9 2
エ タ ノ ー ル	1 7. 2 6	8. 9 2
酢 酸	6 7. 7 4	3 0. 5 7

表 2 5 の結果から明らかなように、環状四糖は包接能を有しており、  
 5 その包接能は、分枝サイクロデキストリンのそれと比べ、重量当たり約  
 2 倍もの強さであることが判明した。

### 実験 3 3 甘味度

実験 2 4 の方法で得られた環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を脱イオン水に  
 10 溶かし固形物当たり 1 0 % 水溶液を調製し、この環状四糖 1 0 % 水溶液  
 を基準とし、蔗糖（市販グラニュー糖）の濃度を変え、パネラー 5 名で  
 官能試験を行なった。その結果、環状四糖の甘味度は、蔗糖の約 2 0 %  
 であった。

### 15 実験 3 4 消化性試験

実験 1 4 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を用いて、『日本栄  
 養食糧学会誌』、第 4 3 巻、2 3 乃至 2 9 頁（1 9 9 0 年）に記載の岡  
 田等の方法に準じて、試験管内での唾液アミラーゼ、合成胃液、膵液ア  
 ミラーゼ、小腸粘膜酵素による環状四糖の消化性を調べた。対照として  
 20 、難消化性糖質として知られているマルチトールを用いた。結果を表 2  
 6 に示す。

表 2 6

消 化 酵 素	消化酵素による分解率 (%)	
	環状四糖	マルチトール (対照)
唾液アミラーゼ	0. 0	0. 0
合成胃液	0. 0	0. 0
膵液アミラーゼ	0. 0	0. 0
小腸粘膜酵素	0. 7 4	4. 0

5        表 2 6 の結果から明らかなように、環状四糖は、唾液アミラーゼ、合成胃液、膵液アミラーゼで全く消化されず、小腸粘膜酵素によって僅かに消化されたが、その程度は 0. 7 4 % と低値であり、対照の難消化性糖質マルチトールの 1 / 5 以下であり、環状四糖が極めて消化されにくい糖質であることが判明した。

10

### 実験 3 5        醗酵性試験

実験 2 4 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を用いて、『ジャーナル・オブ・ニュートリショナル・サイエンス・アンド・ビタミンロジー ( J o u r n a l   o f   N u t r i t i o n a l   S c i e n c e  
15        a n d   V i t a m i n o l o g y ) 』、第 3 7 巻、5 2 9 乃至 5 4 4 頁 ( 1 9 9 1 年 ) に記載の Oku らの方法に準じて、ラット盲腸内容物による環状四糖の発酵性を調べた。盲腸内容物は、ウィスター系雄ラットをエーテル麻酔下で屠殺し嫌氣的に採取し、4 倍量の 0. 1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液に懸濁したものをを用いた。環状四糖は盲腸内容物  
20        重量当たり約 7 % を添加し、添加直後及び 1 2 時間後に残存する環状四

糖量はガスクロマトグラフィー法で定量した。その結果、添加直後の環状四糖濃度は盲腸内容物 g 当たり 68.0 mg、12 時間後の環状四糖濃度は盲腸内容物 1 g 当たり 63.0 mg であり、93% が醗酵されず残存していることがわかり、環状四糖は極めて醗酵されにくい糖質であることが判明した。

### 実験 36 資化性試験

実験 24 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を用いて、『腸内フローラと食物因子』、光岡知足編、学会出版センター（1984 年）に記載の方法に準じて、各種腸内細菌による資化性を調べた。即ち、予め培養しておいた新鮮な菌を、環状四糖を 0.5% 添加した P Y F 培地 5 ml に約  $10^7$  CFU 接種し、嫌気条件下で 37℃ で 4 日間培養した。対照として、資化されやすい糖質グルコースを用いた。資化性の判定は、培養後の培養液の pH が 6.0 以上の場合、資化されない（-）とし、6.0 未満の場合、資化される（+）とした。更に、培養液中に残存する糖質をアンスロン法で測定し糖質の減少量を調べ、資化性の判定を追認した。結果を表 27 に示す。

表 27

腸内細菌株	資 化 性	
	環 状 四 糖	グルコース（対照）
<i>Bacteroides vulgatus</i> JCM5826	－	＋
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> JCM1275	－	＋
<i>Clostridium perfringens</i> JCM3816	－	＋
<i>Escherichia coli</i> IFO3301	－	＋
<i>Eubacterium aerofaciens</i> ATCC25986	－	＋
<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM1132	－	＋

表 2 7 の結果から明らかなように、環状四糖は、試験した腸内細菌株  
のいずれにも資化されず、対照のグルコースはいずれにも資化されたこ  
5 とから、環状四糖が腸内細菌に極めて資化されにくい糖質であることが  
判明した。

実験 3 7      急性毒性試験

マウスを使用して、実験 2 4 の方法で得た環状四糖高含水結晶を経口  
10 投与して急性毒性試験を行なった。その結果、環状四糖は低毒性の物質  
で、投与可能な最大投与量においても死亡例は認められなかった。従っ  
て、その LD<sub>50</sub> 値は、5 0 g / k g マウス体重以上であることが判明し  
た。

5 以上の実験 33 乃至 37 の結果から、環状四糖は、経口摂取しても、消化、吸収されにくく、無カロリー乃至低カロリーの可食素材として、ダイエット甘味料、高甘味度甘味料の賦形剤、ダイエット飲食物の増粘剤、増量剤、賦形剤、更には、食物繊維、脂肪代替食品材料などとして有利に利用できる。

以下、本発明の環状四糖、それを含む糖質の製造方法を実施例 A で、環状四糖、それを含む糖質を含有せしめた組成物を実施例 B で示す。

#### 実施例 A - 1

10 バチルス・グロビスポルス C11 (FERM BP-7144) を実験 6 の方法に準じて、ファーメンターで 48 時間培養した。培養後、SF 膜を用いて除菌濾過し、約 18 L の培養濾液を回収し、更に、その濾液を UF 膜濃縮し、本発明の粗  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素液約 1 L (30.2 単位/ml) を回収した。次いで、パノース (株式会社林原生物化学研究所製造) を 10% 濃度になるように水に溶解させた後、pH 15 6.0、温度 35℃ に調製し、これに上記の方法で調製した粗  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素をパノース 1 g 当たり 2 単位の割合になるように加え、36 時間反応させた。その反応液を 95℃ に加熱し 10 分間保った後、冷却し、濾過して得た濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H 20 型及び OH 型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に、濃縮し、乾燥し、粉碎して、環状四糖含有粉末を固形物当たり収率約 91% で得た。

本品は、固形物当たり、グルコース 34%、イソマルトース 2.1%、パノース 2.3%、環状四糖 45.0%、イソマルトシルパノース 4 25 .8%、イソマルトシルパノシド 1.8%、及びその他の糖質を 10.0% 含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、

甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品などの組成物に有利に利用できる。

#### 5 実施例 A - 2

粉末マルトース（株式会社林原製造、登録商標『サンマルト』）を 30 % 水溶液とし、これに  $\alpha$ -グルコシダーゼを含有する酵素剤（天野製薬株式会社、商品名『トランスグルコシダーゼ L アマノ』）をマルトース固形物当たり 0.08 % 加え、pH 5.5 に調整し、55 °C で 18  
10 時間反応させ、次いで加熱失活させた後、pH 6.0、温度 35 °C に調製し、これに実施例 A - 1 の方法で調製した粗  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を固形物 1 g 当たり 2 単位の割合になるように加え、36 時間反応させた。その反応液を 95 °C に加熱し 10 分間保った後、冷却し、濾過して得た濾液を常法に従って活性炭で脱色し、H 型及び OH 型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度 70 % のシラップを固  
15 形物当たり収率約 92 % で得た。

本品は、固形物当たり、グルコース 32.5 %、マルトース 15.7 %、イソマルトース 9.8 %、マルトトリオース 4.0 %、パノース 0.3 %、イソマルトトリオース 1.6 %、環状四糖 17.5 %、イソマルトシルパノース 1.2 %、イソマルトシルパノシド 0.7 %、及びその他の糖質を 16.7 % 含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、  
20 医薬品などの組成物に有利に利用できる。

25

#### 実施例 A - 3

プルラン（株式会社林原製造）を 5 % 水溶液とし、これに  $\beta$ -アミラーゼ（生化学工業株式会社製造）及びプルラナーゼ（株式会社林原生物化学研究所製造）をプルラン固形物 1 g 当たりそれぞれ 500 単位、20 単位の割合で加え、pH 6.0 に調整し、45℃で 48 時間反応させ、次いで加熱失活させた後、pH 6.0、温度 35℃に調整し、これに実験 4 の方法で調製した精製  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を固形物 1 g 当たり 2 単位の割合になるように加え、36 時間反応させた。その反応液を 95℃に加熱し 10 分間保った後、冷却し、濾過して得た濾液を常法に従って活性炭で脱色し、H 型及び OH 型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度 70 % のシラップを固形物当たり収率約 90 % で得た。

本品は、固形物当たり、グルコース 10.7 %、マルトース 62.7 %、マルトトリオース 0.1 %、環状四糖 22.6 %、イソマルトシルマルトース 1.0 %、及びその他の糖質を 2.9 % 含有しており、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品などの組成物に有利に利用できる。

#### 実施例 A-4

とうもろこし澱粉を濃度 33 % 澱粉乳とし、これに濃度 0.1 % となるように炭酸カルシウムを加えて pH 6.5 に調整し、これに  $\alpha$ -アミラーゼ剤（ノボ社製、商品名『ターマミール 60 L』）澱粉 1 g 当たり 0.2 % になるように加え、95℃で 15 分間反応させ、次いで 120℃で 20 分間オートクレーブし、約 55℃に急冷し、これにイソアミラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製）を澱粉 1 g 当たり 1,000 単位及び  $\beta$ -アミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社製）を澱粉 1 g 当たり 60



単位の割合になるように加え、24時間反応させ、次いで加熱失活させた。これを濃度30%、pH5.5、温度55℃に調整した後、 $\alpha$ -グルコシダーゼ剤『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』をマルトース固形物1g当り0.08%加え、18時間反応させ、次いで加熱失活  
5 させた後、pH6.0、温度35℃に調製し、これに実験7の方法で調製した精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を固形物1g当り2単位の割合になるように加え、36時間反応させた。その反応液を95℃に加熱し10分間保った後、冷却し、濾過して得た濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型及びO型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に  
10 濃縮して濃度70%のシラップを固形物当り収率90%で得た。

本品は、固形物当り、グルコース25.1%、マルトース13.8%、イソマルトース13.9%、マルトトリオース3.5%、パノース0.2%、イソマルトトリオース2.0%、環状四糖14.5%、イソマルトシルパノース2.5%、イソマルトシルパノシド1.7%、及びその  
15 他の糖質を22.8%含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

## 20 実施例 A-5

実施例 A-1 の方法で得た環状四糖含有粉末を、濃度5%、pH5.0、温度45℃に調整した後、これに $\alpha$ -グルコシダーゼ剤『トランスグルコシダーゼ L アマノ』、グルコアミラーゼ剤（ナガセ生化学工業株式会社製造、商品名『グルコチーム』）を固形物1g当たりそれぞれ1,500単位及び75単位添加し、24時間反応して、その反応液  
25 を95℃に加熱し、10分間保った後、冷却し、濾過して得た濾液を常

法に従って活性炭で脱色し、H型及びOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度60%のシラップを得た。得られた糖液を、強酸性カチオン交換樹脂『アンバーライトCR-1310、Na型』（オルガノ株式会社製造）を用いてカラム分画を行なった。樹脂を内  
5 径5.4cmのジャケット付きステンレス製カラム4本に充填し、直列につなぎ樹脂層の全長を20mとした。カラム内温度を60℃に維持しつつ、糖液を樹脂に対して5v/v%加え、これに60℃の温水をSV0.13で流して分画し、溶出液の糖組成をHPLC法でモニターし、環状四糖高含有画分を採取し、環状四糖高含有液を固形物当たり収率約  
10 28%で得た。本高含有液は、固形物当たり約99%の環状四糖を含有していた。

本溶液を濃度約70%に濃縮した後、助晶缶にとり、種晶として環状四糖5乃至6含水結晶約2%を加えて徐冷し、晶出率約45%のマスキットを得た。本マスキットを乾燥搭上のノズルより150kg/cm<sup>2</sup>  
15 の高圧にて噴霧した。これと同時に85℃の熱風を乾燥搭の上部より送風し、底部に設けた移送用金網コンベア上に結晶粉末を捕集し、コンベアの下より45℃の温風を送りつつ、該粉末を乾燥搭外に徐々に移動させて、取り出した。この結晶粉末を熟成搭に充填して温風を送りつつ、10時間熟成させ、結晶化と乾燥を完了し、環状四糖5乃至6含水結晶  
20 粉末を得た。

本品は、実質的に還元性を示さず、アミノカルボニル反応を起こしにくく、吸湿性も示さず、取扱いが容易であり、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、  
25 包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品などの組成物に有利に利用できる。

## 実施例 A - 6

実施例 A - 3 の方法で得た環状四糖含有シラップを実施例 A - 5 の方法に準じて  $\alpha$ -グルコシダーゼ処理とグルコアミラーゼ処理をした後、  
5 常法に従って、濾過し、活性炭で脱色、H 型及び OH 型イオン交換樹脂により脱塩し、濃縮して、濃度 65 % の糖液を得た。本糖液を、実施例 A - 5 の方法に準じて強酸性カチオン交換樹脂を用いたカラム分画を行ない、環状四糖高含有画分を採取し、環状四糖高含有液を固形物当たり収率約 10.5 % で得た。本高含有液は、固形物当たり約 98 % の環状  
10 四糖を含有していた。

本溶液を濃度約 80 % に濃縮した後、次いで助晶機に移し、これに種晶として環状四糖 5 乃至 6 含水結晶 1 % 加え、80 °C で 5 分間攪拌助晶し、次いで、アルミ製バットに取り出し、室温で 24 時間晶出熟成させてブロックを調製した。次いで、本ブロックを切削機にて粉碎し、流動  
15 床乾燥して、環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末を得た。

本品は、還元性が極めて低く、実質的にアミノカルボニル反応を起こしにくく、吸湿性も示さず、取扱いが容易であり、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、  
20 粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品などの組成物に有利に利用できる。

## 実施例 A - 7

実施例 A - 6 の方法で得られた環状四糖高含有液を、濃縮しながら連続晶析させ、得たマスキットをバスケット型遠心分離機で分蜜し、結晶  
25 を少量の水でスプレーし、洗浄して高純度の環状四糖 5 乃至 6 含水結晶

を固形物当り約 55% の収率で得た。

本品は、固形物当り純度 98% 以上の高純度環状四糖 5 乃至 6 含水結晶であって、還元性が極めて低く、アミノカルボニル反応を起こしにくく、吸湿性も示さず、取扱いが容易であり、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物、更には、工業試薬、化学原料などにも有利に利用できる。

10

#### 実施例 A - 8

とうもろこし澱粉を濃度 33% の澱粉乳とし、これに炭酸カルシウムを濃度 0.1% となるように加えて pH 6.5 に調製し、さらに、 $\alpha$ -アミラーゼ剤（ノボ社製、商品名『ターマミール 60 L』）を澱粉 1 g 当り 0.2% になるように加え、95℃ で 15 分間反応させ、次いで、120℃ で 20 分間オートクレーブした。オートクレーブ後の反応液を約 55℃ にまで急冷し、pH 5.5 に調製した後、これにイソアミラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製）を澱粉 1 g 当り 500 単位と、 $\beta$ -アミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社製）を澱粉 1 g 当り 60 単位の割合になるように加え、24 時間反応させ、次いで熱失活させた。これに $\alpha$ -グルコシダーゼ剤『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』を固形物 1 g 当り 0.08% 加え、さらに、実験 11 の方法で調製した精製 $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を固形物 1 g 当り 1.5 単位の割合になるように加え、48 時間反応させた。この反応液を 95℃ に加熱して 10 分間保持した後、冷却し、濾過して、得られた濾液を、常法にしたがって活性炭による脱色し、H 型及び OH 型イオン交換樹脂により脱塩

25

して精製し、さらに濃縮して濃度 70% のシラップを固形物当り収率 90% で得た。

本品は、固形物当り、グルコース 23.7%、マルトース 13.8%、イソマルトース 14.1%、マルトトリオース 3.2%、パノース 0.3%、イソマルトトリオース 2.1%、環状四糖 14.0%、イソマルトシルパノース 2.4%、イソマルトシルパノシド 1.9%、及びその他の糖質を 24.5% 含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

#### 実施例 A-9

アルスロバクター・ラモサス S1 (FERM BP-7592) を実験 14 の方法に準じてファーメンターで 48 時間培養した。得られた培養物約 20 L を SF 膜を用いて除菌濾過し、さらに、その濾液を UF 膜濃縮し、本発明の粗  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素液を約 1 L (8.0 単位/mL) を得た。次いで、パノース (株式会社林原生物化学研究所製) を濃度 25% になるように水に溶解させた後、pH 5.5、温度 45°C に調整し、これに上記で得た粗  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素液をパノース 1 g 当り 1.5 単位の割合になるように加え、48 時間反応させた。その反応液を 95°C に加熱して 10 分間保持した後、冷却し、濾過して、得られた濾液を、常法にしたがって、活性炭で脱色し、H 型及び OH 型イオン交換樹脂により立つ円して精製し、さらに、濃縮し、乾燥し、粉碎して、環状四糖含有粉末を固形物当り収率約 93% で得た。

本品は、固形物当り、グルコース 33.3%、イソマルトース 2.5%、パノース 2.0%、環状四糖 44.5%、イソマルトシルパノース

5 5. 2%、イソマルトシルパノシド 1. 3%、及びその他の糖質を 1 1  
3%含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し  
、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包  
接剤、粉末化基剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品などの組成  
物に有利に利用できる。

#### 実施例 B - 1 甘味料

実施例 A - 7 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶 0. 8 重量部に  
、トレハロース含水結晶（株式会社林原商事販売、登録商標『トレハ』  
10 ） 0. 2 重量部、 $\alpha$ -グリコシルステビオシド（東洋精糖株式会社販売  
、商品名『 $\alpha$ G スィート』） 0. 0 1 重量部、及び L-アスパルチルー  
L-フェニルアラニンメチルエステル（商品名『アスパルテム』） 0  
、 0 1 重量部を均一に混合し、顆粒成形機にかけて顆粒状甘味料を得た  
。本品は、甘味の質が優れ、蔗糖の約 2 倍の甘味度を有している。本品  
15 のカロリーは、環状四糖 5 乃至 6 含水結晶が難消化性、難発酵性で実質  
的に無カロリーであることから、甘味度当たり蔗糖の約 1 0 分の 1 であ  
る。しかも、本品は、室温保存下、変質劣化の懸念が無く、安定である  
。従って、本品は、高品質の低カロリー、低う蝕性甘味料として好適で  
ある。

20

#### 実施例 B - 2 ハードキャンディー

濃度 5 5 % 蔗糖溶液 1 0 0 重量部に実施例 A - 2 の方法で得た環状四糖  
含有シラップ 5 0 重量部を加熱混合し、次いで減圧下で水分 2 % 未満に  
なるまで加熱濃縮し、これにクエン酸 0. 6 重量部及び適量のレモン香  
25 料と着色料とを混和し、常法に従って成形し、製品を得た。本品は歯切  
れ、呈味、風味とも良好で、蔗糖の晶出も起こさず、吸湿性少なく、ダ



レも起こさない安定で高品質のハードキャンディーである。

#### 実施例 B - 3 チューインガム

5 ガムベース 3 重量部を柔らかくなる程度に加熱溶融し、これに無水結晶  
マルチトール 2 重量部、キシリトール 2 重量部、実施例 A - 7 の方法で  
得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 2 重量部、及びトレハロース含水結  
晶 1 重量部とを加え、更に適量の香料と着色料とを混合し、常法に従っ  
て、ロールにより練り合わせ、成形、包装して製品を得た。本品は、テ  
クスチャー、呈味、風味良好で、低う蝕性、低カロリーのチューインガ  
ムとして好適である。

#### 実施例 B - 4 加糖練乳

15 原乳 100 重量部に実施例 A - 5 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水  
結晶粉末 2 重量部及び蔗糖 2 重量部を溶解し、プレートヒーターで加熱  
殺菌し、次いで濃度 70 % に濃縮し、無菌状態で缶詰して製品を得た。  
本品は、温和な甘味で風味も良く、フルーツ、コーヒー、ココア、紅茶  
などの調味用に有利に利用できる。

#### 実施例 B - 5 乳酸菌飲料

20 脱脂粉乳 175 重量部、実施例 A - 4 の方法で得た環状四糖含有シラ  
ップ 130 重量部及びラクトスクロース高含有粉末（株式会社林原商事  
販売、登録商標『乳果オリゴ』）50 重量部を水 1,150 重量部に溶  
解し、65℃で30分間殺菌し、40℃に冷却後、これに、常法に従っ  
て、乳酸菌のスターターを30重量部植菌し、37℃で8時間培養して  
25 乳酸菌飲料を得た。本品は、風味良好で、オリゴ糖、環状四糖を含有し  
、乳酸菌を安定に保つだけでなく、ビフィズス菌増殖促進作用、整腸作



用を有する乳酸菌飲料として好適である。

#### 実施例 B - 6 粉末ジュース

噴霧乾燥により製造したオレンジ果汁粉末 33 重量部に対して、実施  
5 例 A - 7 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 50 重量部、無水  
結晶マルチトール 10 重量部、無水クエン酸 0.65 重量部、リンゴ酸  
0.1 重量部、2-O- $\alpha$ -グルコシル-L-アスコルビン酸 0.2 重  
量部、クエン酸ソーダ 0.1 重量部、プルラン 0.5 重量部及び粉末香  
料の適量をよく混合攪拌し、粉碎し微粉末にして、これを流動層造粒機  
10 に仕込み、排風温度 40℃とし、これに実施例 A - 5 の方法で得た環状  
四糖高含有液をバインダーとして適量スプレーし、30 分間造粒し、計  
量、包装して製品を得た。本品は、果汁含有率約 30% の粉末ジュース  
である。また、本品は、異味、異臭がなく、高品質で、低カロリーのジ  
ュースとして商品価値の高いものである。

15

#### 実施例 B - 7 カスタードクリーム

コーンスターチ 100 重量部、実施例 A - 2 の方法で得た環状四糖含  
有シラップ 100 重量部、トレハロース含水結晶 60 重量部、蔗糖 40  
重量部、及び食塩 1 重量部を十分に混合し、鶏卵 280 重量部を加えて  
20 攪拌し、これに沸騰した牛乳 1,000 重量部を徐々に加え、更に火に  
かけて攪拌を続け、コーンスターチが完全に糊化して全体が半透明にな  
った時に火を止め、これを冷却して適量のバニラ香料を加え、計量、充  
填、包装して製品を得た。本品は、なめらかな光沢を有し、風味良好で  
、澱粉の老化も抑制され、高品質のカスタードクリームである。

25

#### 実施例 B - 8 チョコレート

カカオペースト 40 重量部、カカオバター 10 重量部及び実験 15 の方法に準じて製造した環状四糖 1 含水結晶 50 重量部を混合してレフアイナーに通して粒度を下げた後、コンチェに入れて 50℃で 2 昼夜練り上げた。この間にレシチン 0.5 重量部を添加して充分に分散させた。

5 次いで、温度調節機で 31℃に調節し、バターの固まる直前に型に流し込み、泡抜きし、10℃の冷却トンネルを通過させて固化させた。これを型抜きして包装し、製品を得た。本品は、吸湿性がなく、色、光沢共に良く、内部組織も良好であり、口中でなめらかに溶け、上品な甘味と

10 ートとして有用である。

#### 実施例 B-9 ういろうの素

米粉 90 重量部に、コーンスターチ 20 重量部、無水結晶マルチトール 70 重量部、実施例 A-1 の方法で得た環状四糖含有粉末 50 重量部

15 、及びプルラン 4 重量部を均一に混合してういろうの素を製造した。ういろうの素と適量の抹茶と水とを混練し、これを容器に入れて 60 分間蒸し上げて抹茶ういろうを製造した。本品は、照り、口当たりも良好で、風味も良い。また、澱粉の老化も抑制され、日持ちも良く、低カロリー

20 のういろうとしても好適である。

#### 実施例 B-10 あん

原料あずき 10 重量部に、常法に従って、水を加えて煮沸し、渋切り、あく抜きし、水溶性夾雑物を除去して、あずきつぶあん約 21 重量部を得た。この生あんに蔗糖 14 重量部、実施例 A-3 の方法で得た環状

25 四糖含有シラップ 5 重量部及び水 4 重量部を加えて煮沸し、これに少量のサラダオイルを加えてつぶあんを壊さないように練り上げ、製品のあ

んを約 3 5 重量部得た。本品は、色焼け、離水もなく安定で、舌触り、風味良好で、あんパン、まんじゅう、団子、最中、氷菓などの製菓材料として好適である。

5 実施例 B - 1 1 パン

小麦粉 1 0 0 重量部、イースト 2 重量部、蔗糖 5 重量部、実施例 A - 1 の方法で得た環状四糖含有粉末 1 重量部および無機フード 0 . 1 重量部を、常法に従って、水でこね、中種を 2 6 °C で 2 時間発酵させ、その後 3 0 分間熟成、焼き上げた。本品は、色相、すだちとも良好で、適度  
10 な弾力、温和な甘味を有する高品質のパンである。

実施例 B - 1 2 ハム

豚もも肉 1 , 0 0 0 重量部に食塩 1 5 重量部および硝酸カリウム 3 重量部を均一にすり込んで、冷室に 1 昼夜堆積する。これを水 5 0 0 重量  
15 部、食塩 1 0 0 重量部、硝酸カリウム 3 重量部、実施例 A - 5 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 4 0 重量部および香辛料からなる塩漬液に冷室で 7 日間漬け込み、次いで、常法に従い、冷水で洗浄し、ひもで巻き締め、薫煙し、クッキングし、冷却、包装して製品を得た。本品は、色合いもよく、風味良好な高品質のハムである。

20

実施例 B - 1 3 粉末ペプチド

4 0 % 食品用大豆ペプチド溶液（不二製油株式会社販売、商品名『ハイニユート S』） 1 重量部に、実施例 A - 6 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 2 重量部を混合し、プラスチック製バットに入れ、5  
25 0 °C で減圧乾燥し、粉碎して粉末ペプチドを得た。本品は風味良好で、プレミックス、冷菓などの低カロリー製菓材料として有用であるのみな

らず、経口流動食、経管流動食のための難消化性の食物繊維、整腸材料としても有用である。

#### 実施例 B - 1 4 粉末卵黄

5 生卵から調製した卵黄をプレート式加熱殺菌機で 60 乃至 64 °C で殺菌し、得た液状卵黄 1 重量部に対して、実験 16 の方法に準じて製造した環状四糖無水結晶含有粉末 4 重量部の割合で混合した後、バットに移し、一夜放置して、環状四糖 5 乃至 6 含水結晶に変換させてブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、粉末卵黄を得た。

10 本品は、プレミックス、冷菓、焼菓子、乳化剤などの低カロリー製菓材料として有用であるのみならず経口流動食、経管流動食のための難消化の性食物繊維、整腸材料としても有用である。また、美肌剤、育毛剤などとしても有利に利用できる。

#### 15 実施例 B - 1 5 浴用組成物

ユズの皮ジュース 1 重量部に対して、実験 16 の方法に準じて製造した環状四糖無水結晶含有粉末 10 重量部の割合で混合し、環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を晶出、熟成させた後、粉末化して、ユズの皮エキス含有環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末を得た。

20 本粉末 5 重量部に、焼塩 90 重量部、トレハロース含水結晶 2 重量部、無水ケイ酸 1 重量部及び  $\alpha$ -グルコシルヘスペリジン（株式会社林原販売、商品名  $\alpha$ Gヘスペリジン）0.5 重量部を混合して浴用剤を製造した。

本品は、ユズの香りも豊かで、入浴用の湯に 100 乃至 10,000  
25 倍に希釈して利用すればよく、入浴後は、肌がしっとりしなめらかで、湯冷めしない高品質の浴用剤である。

### 実施例 B - 1 6 皮膚外用クリーム

モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール 2 重量部、自己乳化  
型モノステアリン酸グリセリン 5 重量部、実施例 A - 5 の方法で得た環  
5 状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 2 重量部、 $\alpha$ -グルコシル ルチン（株式  
会社林原販売、商品名  $\alpha$  G ルチン） 1 重量部、流動パラフィン 1 重量部  
、トリオクタン酸グリセリン 1 0 重量部および防腐剤の適量を常法に従  
って加熱溶解し、これに L-乳酸 2 重量部、1, 3-ブチレングリコー  
ル 5 重量部および精製水 6 6 重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化  
10 し、更に香料の適量を加えて攪拌混合し、化粧用クリームを製造した。  
本品は、抗酸化性を有し、安定性が高く、高品質の日焼け止め、美肌剤  
、色白剤などとして有利に利用できる。

### 実施例 B - 1 7 練歯磨

15 第二リン酸カルシウム 4 5 重量部、ラウリル硫酸ナトリウム 1 . 5 重  
量部、グリセリン 2 5 重量部、ポリオキシエチレンソルビタンラウレート  
0 . 5 重量部、実施例 A - 2 の方法で得た環状四糖含有シラップ 1 5 重  
量部、サッカリン 0 . 0 2 重量部および防腐剤 0 . 0 5 重量部を水 1 3  
重量部と混合して練歯磨を得た。本品は、界面活性剤の洗浄力を落とす  
20 ことなく、嫌味を改良し、使用後感も良好である。

### 実施例 B - 1 8 流動食用固体製剤

実施例 A - 6 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 1 0 0 重量  
部、トレハロース含水結晶 2 0 0 重量部、マルトテトラオース高含有粉  
25 末 2 0 0 重量部、粉末卵黄 2 7 0 重量部、脱脂粉乳 2 0 9 重量部、塩化  
ナトリウム 4 . 4 重量部、塩化カリウム 1 . 8 重量部、硫酸マグネシウ

ム 4 重量部、チアミン 0. 0 1 重量部、アスコルビン酸ナトリウム 0. 1 重量部、ビタミン E アセテート 0. 6 重量部及びニコチン酸アミド 0. 0 4 重量部からなる配合物を調製し、この配合物 2 5 g ずつ防湿性ラミネート小袋に充填し、ヒートシールして製品を得た。

- 5      本品は、環状四糖により難消化性の食物繊維を強化し、整腸作用に優れた流動食である。1 袋分を約 1 5 0 乃至 3 0 0 m l の水に溶解して流動食とし、経口的、又は鼻腔、胃、腸などへ経管的使用方法により利用され、生体へのエネルギー補給用に有利に利用できる。

10    実施例 B - 1 9      皮膚外用ローション

以下の成分を以下の配合にしたがって常法により混合し、ローションを製造した。

	1 % ヒアルロン酸ナトリウム水溶液	1 8 重量部
	実施例 A - 6 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末	
15		1 重量部
	D L - セリン	0. 0 5 重量部
	マルチトール	0. 2 重量部
	グリセリン	2 重量部
	パラオキシ安息香酸メチル	0. 0 5 重量部
20	水酸化カリウム	0. 0 1 重量部
	ポリオキシエチレン ( 1 5 モル付加 ) オレイルエーテル	
		0. 3 重量部
	エタノール	3 重量部
	香料	適量
25	精製水	残余
	合計	1 0 0 重量部

本ローションは、皮膚への水分の浸透性に優れ、皮膚の保湿性に優れるので基礎化粧品として有用である。また、本ローションは皮膚の角質層を軟化する作用をも比較的顕著に発揮するので、寒冷季に利用する化粧品や、中高年層を対象とする化粧品としても有用である。

#### 実施例 B - 20 皮膚外用クリーム

メチルポリシロキサン 0.3 重量部、ステアリン酸 6 重量部、親油性モノステアリン酸グリセリン 3.5 重量部、スクワラン 2.5 重量部、2-エチルヘキセン酸セチル 5.5 重量部、モノステアリン酸ポリオキシエチレン（20 モル付加）ソルビタン 3 重量部を 85℃ に加熱しつつ均一に混合した（A 液）。別途、95% グリセリン 2 重量部、マルチトール 2 重量部、実施例 A - 7 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶 3.5 重量部に適量の精製水を加えて 70℃ に加熱しつつ十分に溶解させた（B 液）。この A 液と B 液を混合し、均一に攪拌した後、これに 34 重量部の精製水を加え、乳化ミキサーを用いて常法により乳化した。この乳化物を 35℃ にまで冷却し、これに、2-O- $\alpha$ -D-グルコシル-L-アスコルビン酸 2 重量部を加えた後、適量のクエン酸を加えて pH 約 6 に調整し、さらに精製水を加えて全量を 100 重量部としてクリームを製造した。

本クリームは、皮膚の保湿性に優れる上、皮膚に対する刺激性が極めて低いので、基礎化粧品として有用である。また、本品は、乳化状態が安定に保たれるので、比較的長期の保存にも耐えるという特徴を有している。

#### 実施例 B - 21 皮膚清浄用液状組成物



30%ヤシ油脂肪酸メチルタウリンナトリウム水溶液20重量部、2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン5重量部、ポリオキシエチレンジオレイン酸メチルグルコシド4重量部を70℃に加温しながら混合・溶解し、適量の水を加え、  
5、これに、実施例A-6の方法で得た環状四糖5乃至6含水結晶粉末2重量部、プロピルパラベン0.2重量部、10%クエン酸水溶液1重量部を加え、さらに精製水を加えて全量を100重量部とし、液状組成物を得た。

本液状組成物は、優れた皮膚清浄効果を発揮する上、皮膚の保湿性に  
10優れるので、日常的に利用するボディーソープとして有用である。

#### 実施例B-22 浴用組成物

乾燥硫酸ナトリウム60重量部、炭酸水素ナトリウム30重量部、ト  
レハロース5重量部、実施例A-6の方法で得た環状四糖5乃至6含水  
15結晶5重量部、シトラス系調合香料1重量部、及び青色2号（インジゴ  
カルミン）0.5重量部を均一に混合して、粉末のこの発明の体臭抑制  
剤を得た。

本品は、浴湯100ℓあたり約20gの割合で添加し、溶解させて利  
用する。本品は、皮膚での保湿効果が優れている上、皮膚からの体臭の  
20発生又は揮散をもよく抑制す上、皮膚への刺激性が極めて低いので、浴  
用剤として日常的に利用することができる。

#### 実施例B-23 錠剤

アスピリン50重量部に実施例A-7の方法で得た環状四糖5乃至6  
25含水結晶14重量部、コーンスターチ4重量部を十分に混合した後、常  
法に従って打錠機により打錠して厚さ5.25mm、1錠680mgの

錠剤を製造した。

本品は、環状四糖の賦形性を利用したもので、吸湿性がなく、物理的強度も充分にあり、しかも水中での崩壊はきわめて良好である。

5 実施例 B - 2 4 糖衣錠

重量 1 5 0 m g の素錠を芯剤とし、これに実施例 A - 7 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶 4 0 重量部、プルラン（平均分子量 2 0 万）2 重量部、水 3 0 重量部、タルク 2 5 重量部および酸化チタン 3 重量部からなる下掛け液を用いて錠剤重量が約 2 3 0 m g になるまで糖衣し、  
10 次いで、同じ環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 6 5 重量部、プルラン 1 重量部および水 3 4 重量部からなる上掛け液を用いて、糖衣し、更に、ロウ液で艶出しして光沢のある外観の優れた糖衣錠を得た。本品は、耐衝撃性にも優れており、高品質を長期間維持する。

15 実施例 B - 2 5 外傷治療用膏薬

実施例 A - 6 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 1 0 0 重量部およびマルトース 3 0 0 重量部に、ヨウ素 3 重量部を溶解したメタノール 5 0 重量部を加え混合し、更に 1 0 w / v % プルラン水溶液 2 0 0 重量部を加えて混合し、適度の延び、付着性を示す外傷治療用膏薬を得た。本品は、環状四糖によりヨウ素、メタノールの揮散を防止し、経時変化が少ない商品価値の高い膏薬である。

また、本品は、ヨウ素による殺菌作用のみならず、マルトースによる細胞へのエネルギー補給剤としても作用することから治癒期間が短縮され、創面もきれいに治る。

25

産業上の利用可能性

以上説明したように、本発明は、新規な $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素、当該酵素の製造方法、及び用途を提供する発明である。本発明の新規な $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を用いることにより、産業上有用なサイクロ $\{\rightarrow 6\}$ - $\alpha$ -D-グルコピラノシル-( $1 \rightarrow 3$ )- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-( $1 \rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-( $1 \rightarrow 3$ )- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-( $1 \rightarrow$ )の構造を有する環状四糖、これを含む糖質及び組成物を、工業的に安価かつ大量に製造することが可能となった。斯かる環状四糖又はこれを含む糖質は、実質的に非還元性乃至低還元性で、アミノカルボニル反応を起こしにくく、吸湿性も示さず、  
取扱いが容易であり、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性、を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品などの組成物に有利に利用できる。  
本発明は斯くも顕著な作用効果を有する発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明である。

## 請求の範囲

1. 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から、 $\alpha$ -イソマルトシル転移を含む反応によって、サイクロ $\{\rightarrow 6\}-\alpha-D$ -グルコピラノシルー $(1 \rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシルー $(1 \rightarrow 6)-\alpha-D$ -グルコピラノシルー $(1 \rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシルー $(1 \rightarrow)$ の構造を有する環状四糖を生成する $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素。
2. 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質が、パノース、イソマルトシルマルトース、イソマルトシルパノース及びイソマルトシルパノシドから選ばれる1種又は2種以上の糖質である請求の範囲第1記載の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素。
3.  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素が、微生物由来の酵素である請求の範囲第1項又は第2項記載の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素。
4. 下記の理化学的性質を有する $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素。
- (1) 作用
- 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から、 $\alpha$ -イソマルトシル転移を含む反応によって、サイクロ $\{\rightarrow 6\}-\alpha-D$ -グルコピラノシルー $(1 \rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシルー $(1 \rightarrow 6)-\alpha-D$ -グルコピラノシルー $(1 \rightarrow 3)-\alpha-D$ -グルコピラノシルー $(1 \rightarrow)$ の構造を有する環状四糖を生成する。

(2) 分子量

S D S - ゲル電気泳動法において約 82,000 ダルトン乃至約 136,000 ダルトンの範囲内に確認される分子量を有する。

(3) 等電点

5 アンフォライン含有電気泳動法において pI 約 3.7 乃至 pI 約 8.3 の範囲内に確認される等電点を有する。

(4) 至適温度

pH 6.0、30 分間反応の条件下において約 45 °C 乃至約 50 °C の範囲内に確認される至適温度を有する。

10 (5) 至適 pH

35 °C、30 分間反応の条件下において pH 約 5.5 乃至 pH 約 6.5 の範囲内に確認される至適 pH を有する。

(6) 温度安定性

15 pH 6.0、60 分間保持の条件下における安定温度域を約 45 °C 以下に有する。

(7) pH 安定性

4 °C、24 時間保持の条件下における安定 pH 域を pH 約 3.6 乃至約 pH 10.0 の範囲内に有する。

5. 非還元末端の結合様式として  $\alpha$ -1,6 グルコシル結合を有し、  
20 この非還元末端以外の結合様式として  $\alpha$ -1,4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が 3 以上の糖質から、 $\alpha$ -イソマルトシル転移を含む反応によって、サイクロ { $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ )} の構造を有  
25 する環状四糖を生成する作用を有し、配列表における配列番号 1 乃至 8 に示すアミノ酸配列から選ばれる 1 種又は 2 種以上の配列を有するイソ

マルトシル転移酵素。

6.  $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素が精製又は粗酵素であることを特徴とする請求の範囲第1項乃至第5項のいずれかに記載の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素。

5 7. 請求の範囲第1項乃至第5項のいずれかに記載の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素産生能を有する微生物を栄養培地で培養して得られる培養物から、請求の範囲第1項乃至第6項のいずれかに記載の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を採取することを特徴とする $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の製造方法。

10 8. 微生物がバチルス属又はアルスロバクター属の微生物である請求の範囲第7項記載の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素の製造方法。

9. バチルス・グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) C9 (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、寄託番号 FERM BP-7143)、バチルス・グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) C11 (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、寄託番号 FERM BP-7144)、バチルス・グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) N75、(独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、寄託番号 FERM BP-7591)、アルスロバクター・ラモサス (*Arthrobacter ramosus*) S1 (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、寄託番号 FERM BP-7592)、アルスロバクター・グロビホルミス (*Arthrobacter globiformis*) A19 (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、寄託番号 FERM BP-7590)、又はそれらの変異株である $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素産生能を有する微生物。

10. 非還元末端の結合様式として $\alpha$ -1, 6グルコシル結合を有し

、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を含有する溶液に、請求の範囲第1項乃至第6項のいずれかに記載の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させることを特徴とする $\alpha$ -イソマルトシル転移反応方法。

5 11. 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質が、パノース、イソマルトシルマルトース、イソマルトシルパノース、及びイソマルトシルパノシドから選ばれる1種又は2種以上の糖質である請求の範囲第10項記載の $\alpha$ -  
10 イソマルトシル転移反応方法。

12. 請求の範囲第10項又は第11項記載の $\alpha$ -イソマルトシル転移反応に際し、D-グルコース、D-キシロース、L-キシロース、D-ガラクトース、D-フラクトース、D-アラビノース、D-フコース、L-ソルボース、L-ラムノース、メチル- $\alpha$ -グルコシド、メチル-  
15 - $\beta$ -グルコシド、D-リボース、L-リボース、D-プシコース、ソルビトール、キシリトール、アラビトール、リビトール、エリスリトール、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、イソマルトース、イソマルトトリオース、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロース、 $\alpha$ 、 $\beta$ -トレハロース、コージビオース、ニゲロース、セロビオース、ゲンチオビオース、イソパノース、マルチトール、マルトトリイ  
20 トール、ラクトース、スクロース、エルロース、イソマルトシルグルコシド、及びL-アスコルビン酸から選ばれる1種又は2種以上の受容体共存下で反応させて糖転移物を生成させることを特徴とする請求の範囲第10項又は第11項記載の $\alpha$ -イソマルトシル転移反応方法。

25 13. 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有



するグルコース重合度が3以上の糖質を含有する溶液に、請求の範囲第1項乃至第6項のいずれかに記載の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させ、得られるサイクロ $\{\rightarrow 6\}$ - $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ )の構造を有する環状四糖、又はこれを含む糖質。

14. 非還元末端の結合様式として $\alpha$ -1, 6グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha$ -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を含有する溶液に、請求の範囲第1項乃至第6項のいずれかに記載の $\alpha$ -イソマルトシル転移酵素を作用させ、サイクロ $\{\rightarrow 6\}$ - $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ )の構造を有する環状四糖とともに他の糖質を含有する溶液とし、これを強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにかけ、得られるサイクロ $\{\rightarrow 6\}$ - $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ )の構造を有する環状四糖の含量を向上させたサイクロ $\{\rightarrow 6\}$ - $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ )の構造を有する環状四糖、又はこれを含む糖質。

15. 環状四糖、又はこれを含む糖質が、サイクロ $\{\rightarrow 6\}$ - $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-グルコピラノシル-(1 $\rightarrow$ )の構造を有する環状四糖を、固形物当り10w/w%以

上含有していることを特徴とする請求の範囲第 13 項又は第 14 項記載  
のサイクロ {→6} - α - D - グルコピラノシル - (1 → 3) - α - D  
- グルコピラノシル - (1 → 6) - α - D - グルコピラノシル - (1 →  
3) - α - D - グルコピラノシル - (1 →} の構造を有する環状四糖、  
5 又はこれを含む糖質。

16. サイクロ {→6} - α - D - グルコピラノシル - (1 → 3) -  
α - D - グルコピラノシル - (1 → 6) - α - D - グルコピラノシル -  
(1 → 3) - α - D - グルコピラノシル - (1 →} の構造を有する環状  
四糖、又はこれを含む糖質が、シラップ、マスキット、非晶質粉末、非  
10 晶質固状物、結晶粉末、又は結晶固状物の形態にあることを特徴とする  
請求の範囲第 13 項、第 14 項又は第 15 項記載のサイクロ {→6} -  
α - D - グルコピラノシル - (1 → 3) - α - D - グルコピラノシル -  
(1 → 6) - α - D - グルコピラノシル - (1 → 3) - α - D - グルコ  
ピラノシル - (1 →} の構造を有する環状四糖、又はこれを含む糖質。

17. 結晶が、サイクロ {→6} - α - D - グルコピラノシル - (1  
→ 3) - α - D - グルコピラノシル - (1 → 6) - α - D - グルコピラ  
ノシル - (1 → 3) - α - D - グルコピラノシル - (1 →} の構造を有  
する環状四糖 5 乃至 6 含水結晶、サイクロ {→6} - α - D - グルコピ  
ラノシル - (1 → 3) - α - D - グルコピラノシル - (1 → 6) - α -  
20 D - グルコピラノシル - (1 → 3) - α - D - グルコピラノシル - (1  
→} の構造を有する環状四糖 1 含水結晶、及びサイクロ {→6} - α -  
D - グルコピラノシル - (1 → 3) - α - D - グルコピラノシル - (1  
→ 6) - α - D - グルコピラノシル - (1 → 3) - α - D - グルコピラ  
ノシル - (1 →} の構造を有する環状四糖無水結晶から選ばれる 1 種又  
25 は 2 種以上の形態にあることを特徴とする請求の範囲第 16 項記載のサ  
イクロ {→6} - α - D - グルコピラノシル - (1 → 3) - α - D - グ

ルコピラノシルー（ $1 \rightarrow 6$ ）－ $\alpha$ －D－グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow 3$ ）  
－ $\alpha$ －D－グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow$ ）の構造を有する環状四糖、又は  
これを含む糖質。

18. 結晶が、有機溶媒を用いることなく水溶液から晶出させたもの  
5 であることを特徴とする請求の範囲第16項又は第17項記載のサイク  
ロ { $\rightarrow 6$ ）－ $\alpha$ －D－グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow 3$ ）－ $\alpha$ －D－グルコ  
ピラノシルー（ $1 \rightarrow 6$ ）－ $\alpha$ －D－グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow 3$ ）－ $\alpha$   
－D－グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow$ ）の構造を有する環状四糖、又はこれ  
を含む糖質。

10 19. 環状四糖を含む糖質が、サイクロ { $\rightarrow 6$ ）－ $\alpha$ －D－グルコピ  
ラノシルー（ $1 \rightarrow 3$ ）－ $\alpha$ －D－グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow 6$ ）－ $\alpha$ －  
D－グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow 3$ ）－ $\alpha$ －D－グルコピラノシルー（ $1$   
 $\rightarrow$ ）の構造を有する環状四糖とともに、グルコース、マルトース、及び  
非還元末端の結合様式として $\alpha$ －1，6グルコシル結合を有し、この非  
15 還元末端以外の結合様式として $\alpha$ －1，4グルコシル結合を有するグル  
コース重合度が3以上の糖質から選ばれる1種又は2種以上の糖質を含  
む糖質である請求の範囲第13項乃至第18項のいずれかに記載のサイ  
クロ { $\rightarrow 6$ ）－ $\alpha$ －D－グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow 3$ ）－ $\alpha$ －D－グル  
コピラノシルー（ $1 \rightarrow 6$ ）－ $\alpha$ －D－グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow 3$ ）－  
20  $\alpha$ －D－グルコピラノシルー（ $1 \rightarrow$ ）の構造を有する環状四糖、又はこ  
れを含む糖質。

20. 非還元末端の結合様式として $\alpha$ －1，6グルコシル結合を有し  
、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha$ －1，4グルコシル結合を有  
するグルコース重合度が3以上の糖質を含有する溶液に、請求の範囲第  
25 1項乃至第6項のいずれかに記載の $\alpha$ －イソマルトシル転移酵素を作用  
させることを特徴とするサイクロ { $\rightarrow 6$ ）－ $\alpha$ －D－グルコピラノシル

— (1 → 3) — α — D — グルコピラノシル — (1 → 6) — α — D — グルコピラノシル — (1 → 3) — α — D — グルコピラノシル — (1 → } の構造を有する環状四糖、又はこれを含む糖質の製造方法。

21. 非還元末端の結合様式として α — 1, 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α — 1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質が、パノース、イソマルトシルマルトース、イソマルトシルパノース及びイソマルトシルパノシドから選ばれる1種又は2種以上の糖質であることを特徴とする請求の範囲第20項記載のサイクロ {→ 6) — α — D — グルコピラノシル — (1 → 3) — α — D — グルコピラノシル — (1 → 6) — α — D — グルコピラノシル — (1 → 3) — α — D — グルコピラノシル — (1 → } の構造を有する環状四糖、又はこれを含む糖質の製造方法。

22. α — イソマルトシル転移酵素を作用させた後、α — アミラーゼ、β — アミラーゼ、グルコアミラーゼ及びα — グルコシダーゼから選ばれる1種又は2種以上の酵素を作用させることを特徴とする請求の範囲第20項又は第21項記載のサイクロ {→ 6) — α — D — グルコピラノシル — (1 → 3) — α — D — グルコピラノシル — (1 → 6) — α — D — グルコピラノシル — (1 → 3) — α — D — グルコピラノシル — (1 → } の構造を有する環状四糖、又はこれを含む糖質の製造方法。

23. α — イソマルトシル転移酵素を作用させた後、脱色、脱塩、カラムクロマトグラフィーによる分画、膜による分離、微生物による醗酵処理及びアルカリ処理による分解除去から選ばれる1種又は2種以上の精製方法を用いることを特徴とする請求の範囲第20項乃至第22項のいずれかに記載のサイクロ {→ 6) — α — D — グルコピラノシル — (1 → 3) — α — D — グルコピラノシル — (1 → 6) — α — D — グルコピラノシル — (1 → 3) — α — D — グルコピラノシル — (1 → } の構造を有

する環状四糖、又はこれを含む糖質の製造方法。

24. サイクロ {→6} - α-D-グルコピラノシル- (1→3) -  
α-D-グルコピラノシル- (1→6) - α-D-グルコピラノシル-  
(1→3) - α-D-グルコピラノシル- (1→} の構造を有する環状  
5 四糖、又はこれを含む糖質が、サイクロ {→6} - α-D-グルコピラ  
ノシル- (1→3) - α-D-グルコピラノシル- (1→6) - α-D-  
グルコピラノシル- (1→3) - α-D-グルコピラノシル- (1→  
} の構造を有する環状四糖を、固形物当り 10 w/w % 以上含有してい  
る請求の範囲 20 項乃至第 23 項のいずれかに記載のサイクロ {→6}  
10 - α-D-グルコピラノシル- (1→3) - α-D-グルコピラノシル  
- (1→6) - α-D-グルコピラノシル- (1→3) - α-D-グル  
コピラノシル- (1→} の構造を有する環状四糖、又はこれを含む糖質  
の製造方法。

25. サイクロ {→6} - α-D-グルコピラノシル- (1→3) -  
15 α-D-グルコピラノシル- (1→6) - α-D-グルコピラノシル-  
(1→3) - α-D-グルコピラノシル- (1→} の構造を有する環状  
四糖、又はこれを含む糖質の形態が、シラップ、マスキット、非晶質粉  
末、非晶質固状物、結晶粉末、又は結晶固状物である請求の範囲第 20  
項乃至第 24 項のいずれかに記載のサイクロ {→6} - α-D-グルコ  
20 ピラノシル- (1→3) - α-D-グルコピラノシル- (1→6) - α  
-D-グルコピラノシル- (1→3) - α-D-グルコピラノシル- (  
1→} の構造を有する環状四糖、又はこれを含む糖質の製造方法。

26. 結晶が、有機溶媒を用いることなく水溶液から晶出させたもの  
である請求の範囲第 25 項記載のサイクロ {→6} - α-D-グルコピ  
25 ラノシル- (1→3) - α-D-グルコピラノシル- (1→6) - α-D-  
グルコピラノシル- (1→3) - α-D-グルコピラノシル- (1

→} の構造を有する環状四糖、又はこれを含む糖質の製造方法。

27. 請求の範囲第13項乃至第19項のいずれかに記載のサイクロ  
{→6) - α-D-グルコピラノシル - (1→3) - α-D-グルコピ  
ラノシル - (1→6) - α-D-グルコピラノシル - (1→3) - α-D-  
5 D-グルコピラノシル - (1→} の構造を有する環状四糖、又はこれを含む糖質を含有せしめた組成物。

28. サイクロ {→6) - α-D-グルコピラノシル - (1→3) -  
α-D-グルコピラノシル - (1→6) - α-D-グルコピラノシル -  
(1→3) - α-D-グルコピラノシル - (1→} の構造を有する環状  
10 四糖、又はこれを含む糖質を、甘味性、難醗酵性、低う蝕性、低カロリー性、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、離水防止性、固結防止性、包接性、保香性、安定性、他の糖の晶出防止性、澱粉老化防止性、蛋白質変性防止性、脂質劣化防止性、耐酸性、耐熱性、若しくはアミノカルボニル反応を起こしにくい特性を有する糖質として、又は、  
15 甘味料、低う蝕性食品素材、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、保香剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、若しくは粉末化基剤として含有させた請求の範囲第27項記載の組成物。

29. 組成物が、飲食物、化粧品又は医薬品である請求の範囲第27  
20 項又は第28項記載の組成物。

30. 組成物が、皮膚外用組成物である請求の範囲第27項乃至第29項のいずれかに記載の組成物。

31. サイクロ {→6) - α-D-グルコピラノシル - (1→3) -  
α-D-グルコピラノシル - (1→6) - α-D-グルコピラノシル -  
25 (1→3) - α-D-グルコピラノシル - (1→} の構造を有する環状四糖を固形物当たり0.1w/w%以上含有せしめた請求の範囲第27

項乃至第 30 のいずれかに記載の組成物。

32. サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖とともに、グルコース、マルトース、パノース、イソマルトシルマルトース、イソマルトシルパノース、及びイソマルトシルパノシドから選ばれる 1 種又は 2 種以上の糖質を含有している糖質。

33. サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖を、固形物当り 10 w/w % 以上含有していることを特徴とする請求の範囲第 32 項記載の糖質。

34. 形態が、シラップ、マスキット、非結晶粉末、非結晶固状物、結晶粉末、又は結晶固状物である請求の範囲第 32 項又は第 33 項記載の糖質。

35. 結晶が、サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖 5 乃至 6 含水結晶、サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖 1 含水結晶、又はサイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖無水結晶である請求の範囲第 34 項に記載の糖質。



36. サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  
 $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル -  
( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ ) の構造を有する環状  
四糖 5 乃至 6 含水結晶、サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル  
- ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グル  
コピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ ) の構  
造を有する環状四糖 1 含水結晶、又はサイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グル  
コピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  
 $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル -  
10 ( $1 \rightarrow$ ) の構造を有する環状四糖無水結晶。

37. 有機溶媒を用いることなく水溶液から晶出させたものである請  
求の範囲第 34 項、第 35 項又は第 36 項記載の糖質。

38. 糖質が、甘味料、低う蝕性食品素材、低カロリー食品素材、呈  
味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、保香剤、安定剤、賦  
15 形剤、包接剤、又は粉末化基材である請求の範囲第 32 項乃至第 37 項  
のいずれかに記載の糖質。

39. 請求の範囲第 32 項乃至第 38 項のいずれかに記載の糖質を含  
有せしめた組成物。

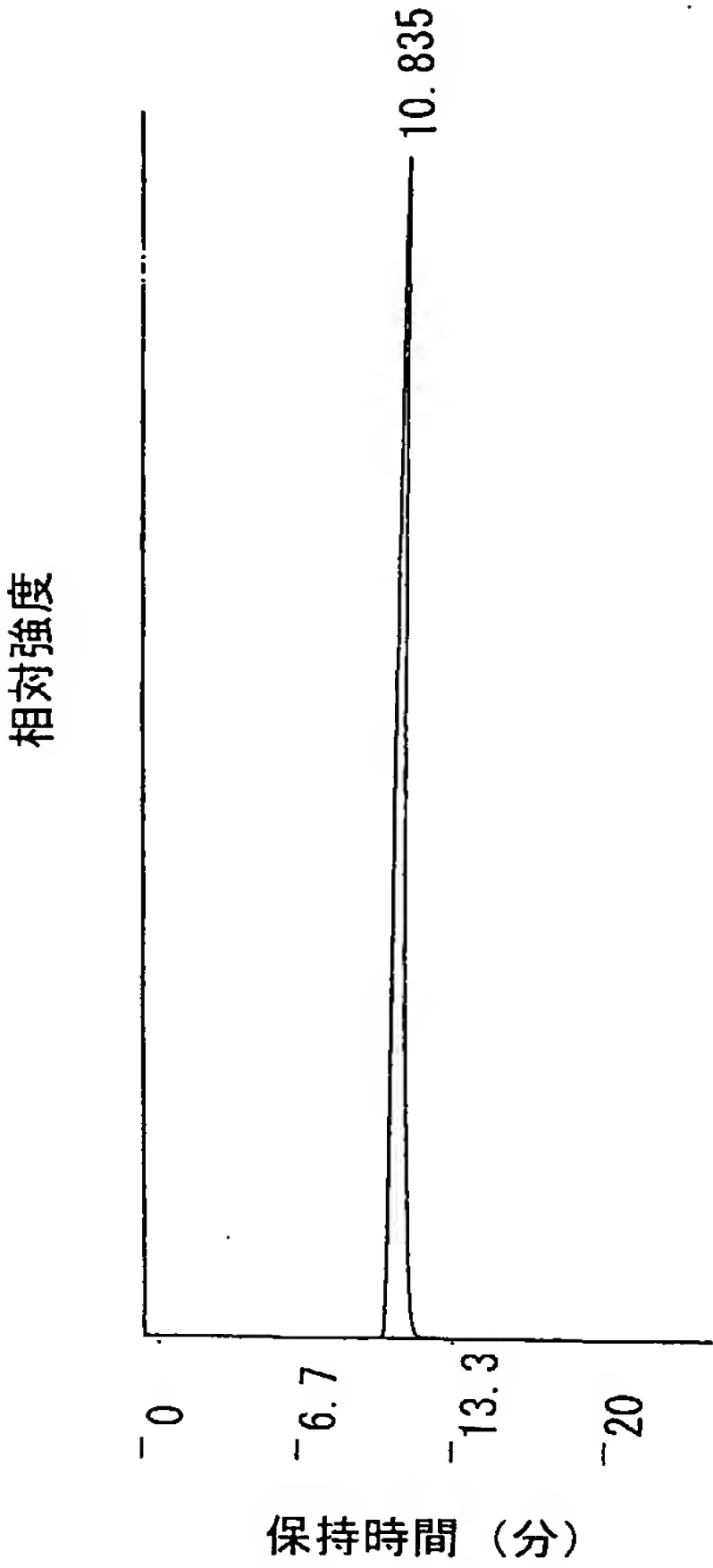
40. 組成物が、飲食物、化粧品又は医薬品である請求の範囲第 39  
20 項記載の組成物。

41. 組成物が、皮膚外用組成物である請求の範囲第 39 項記載の組  
成物。

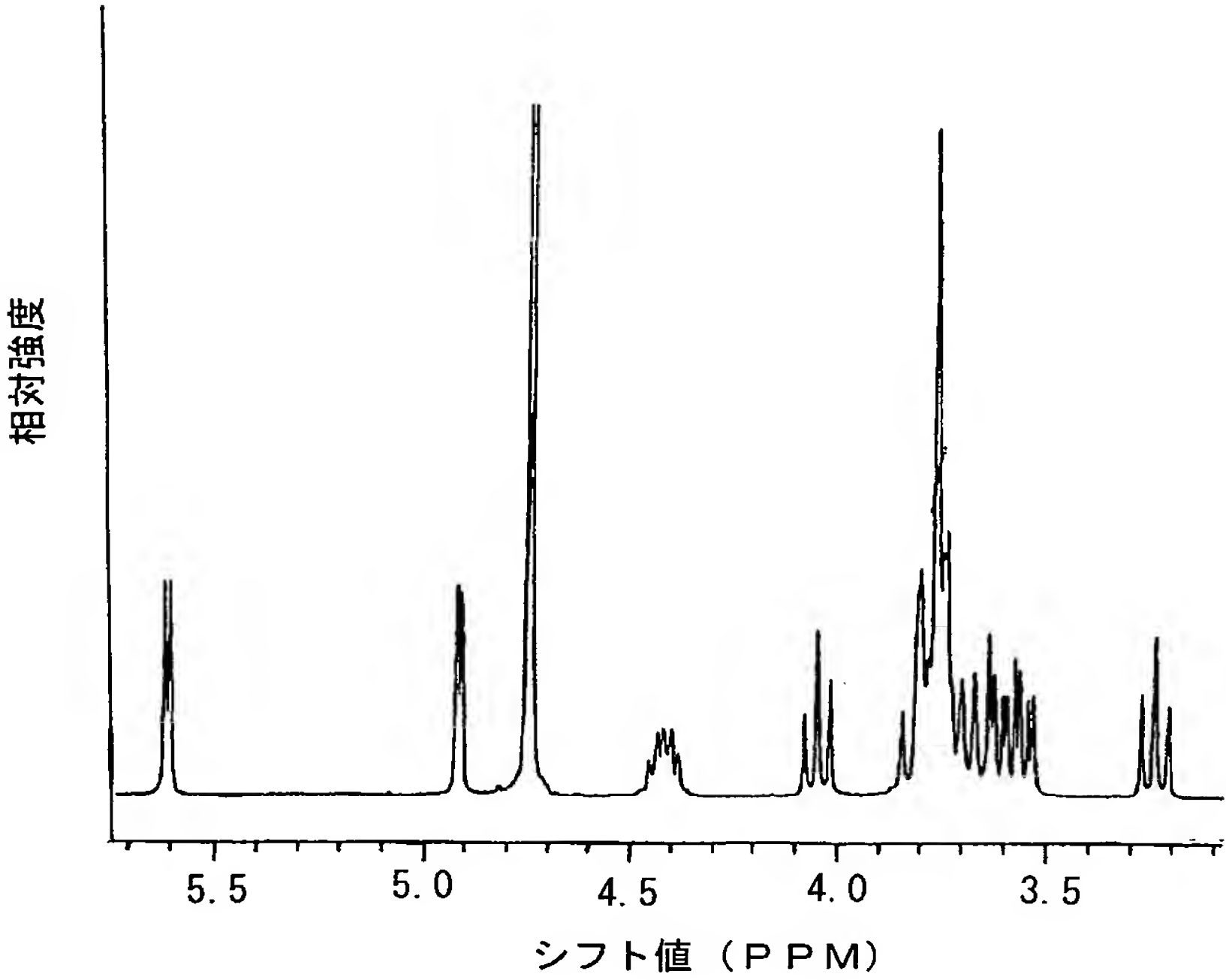
42. サイクロ { $\rightarrow 6$ } -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 3$ ) -  
 $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow 6$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル -  
25 ( $1 \rightarrow 3$ ) -  $\alpha$  - D - グルコピラノシル - ( $1 \rightarrow$ ) の構造を有する環状  
四糖を、固形物当たり 0.1 w/w % 以上含有することを特徴とする請

求の範囲第 39 項、第 40 項又は第 41 項記載の組成物。

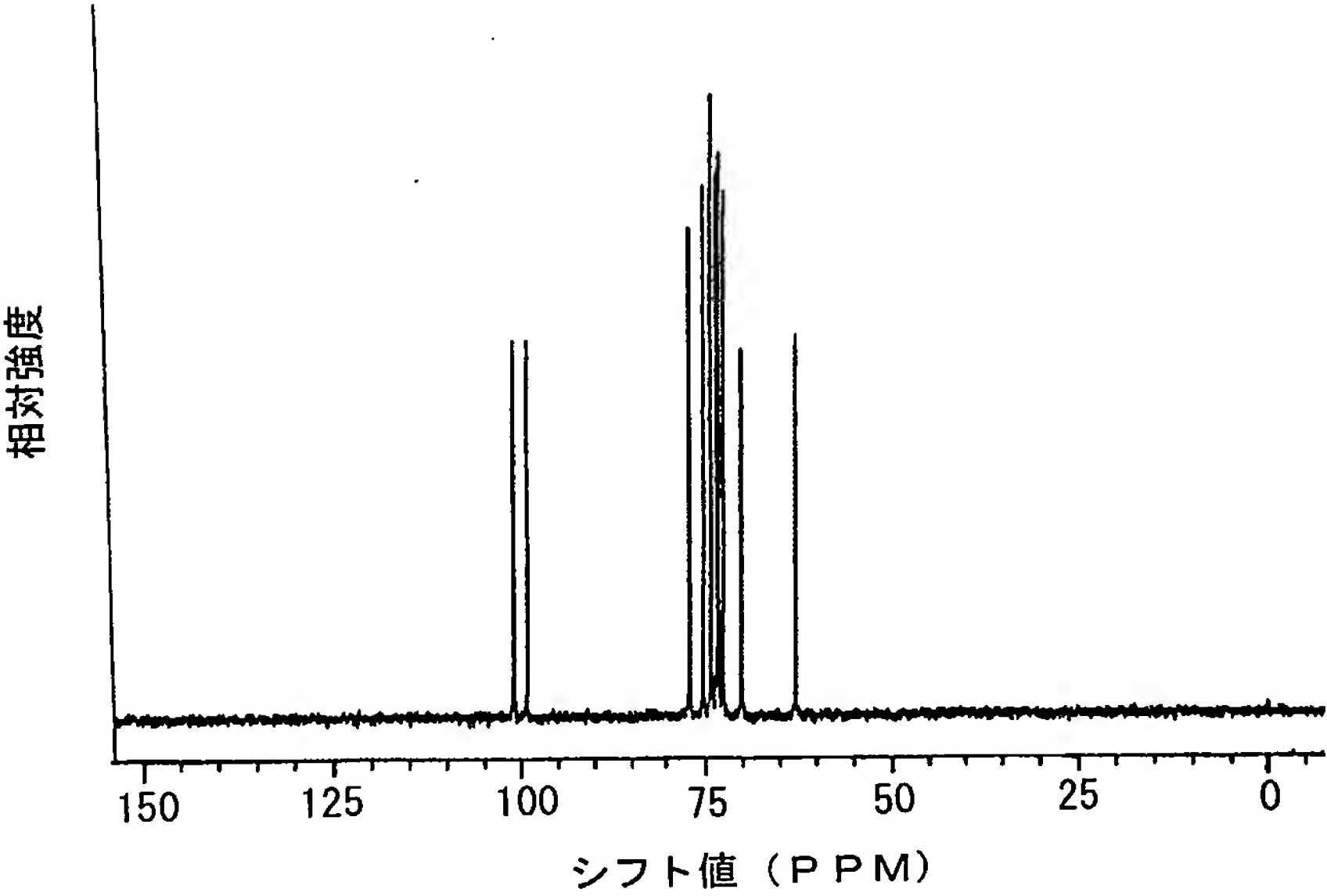
第 1 図



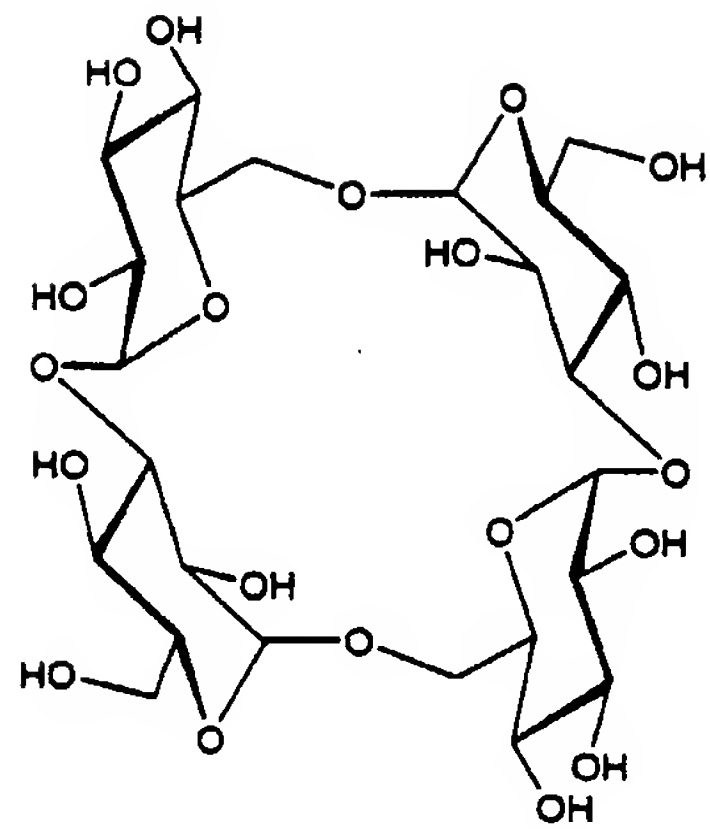
第 2 図



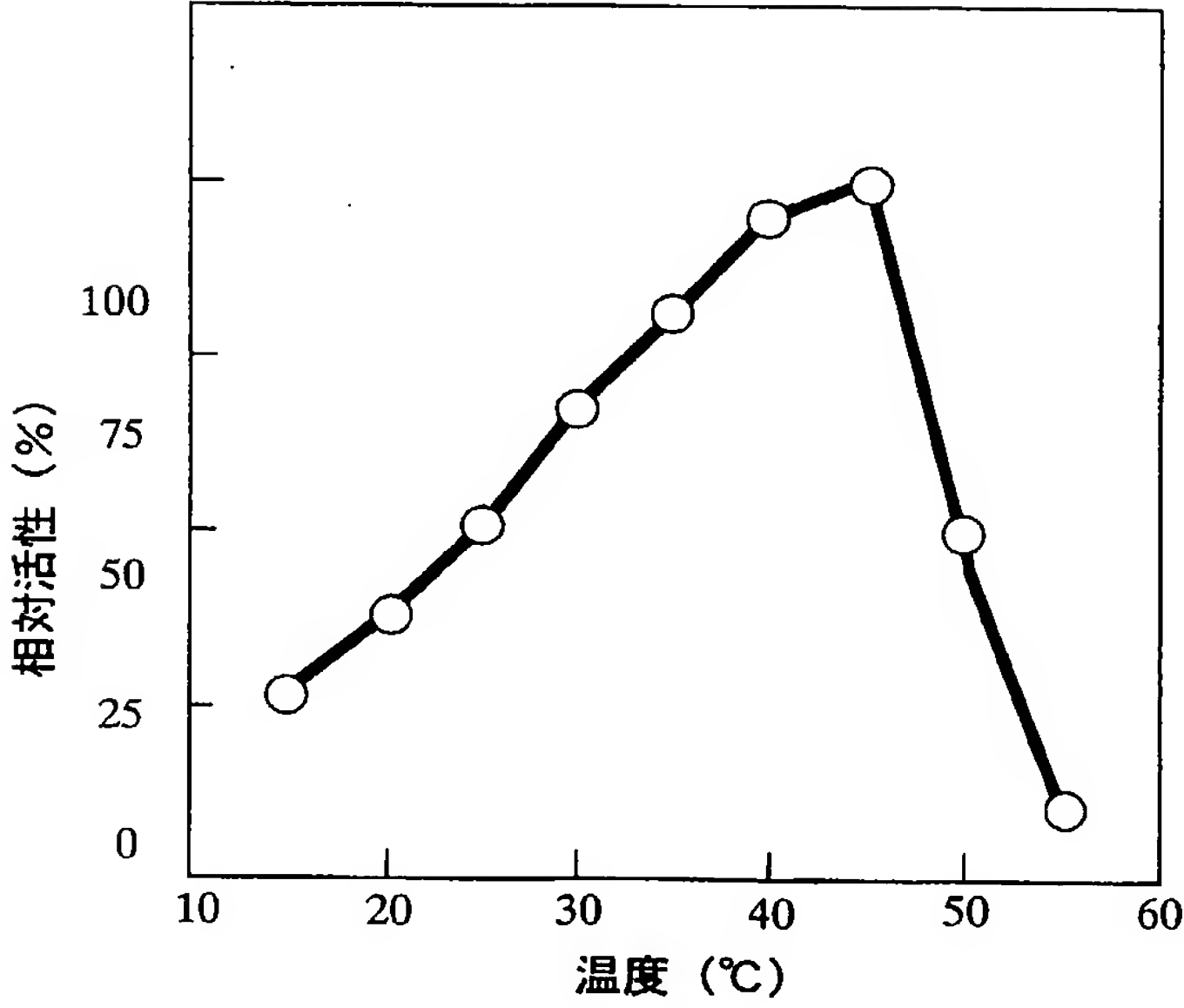
第 3 図



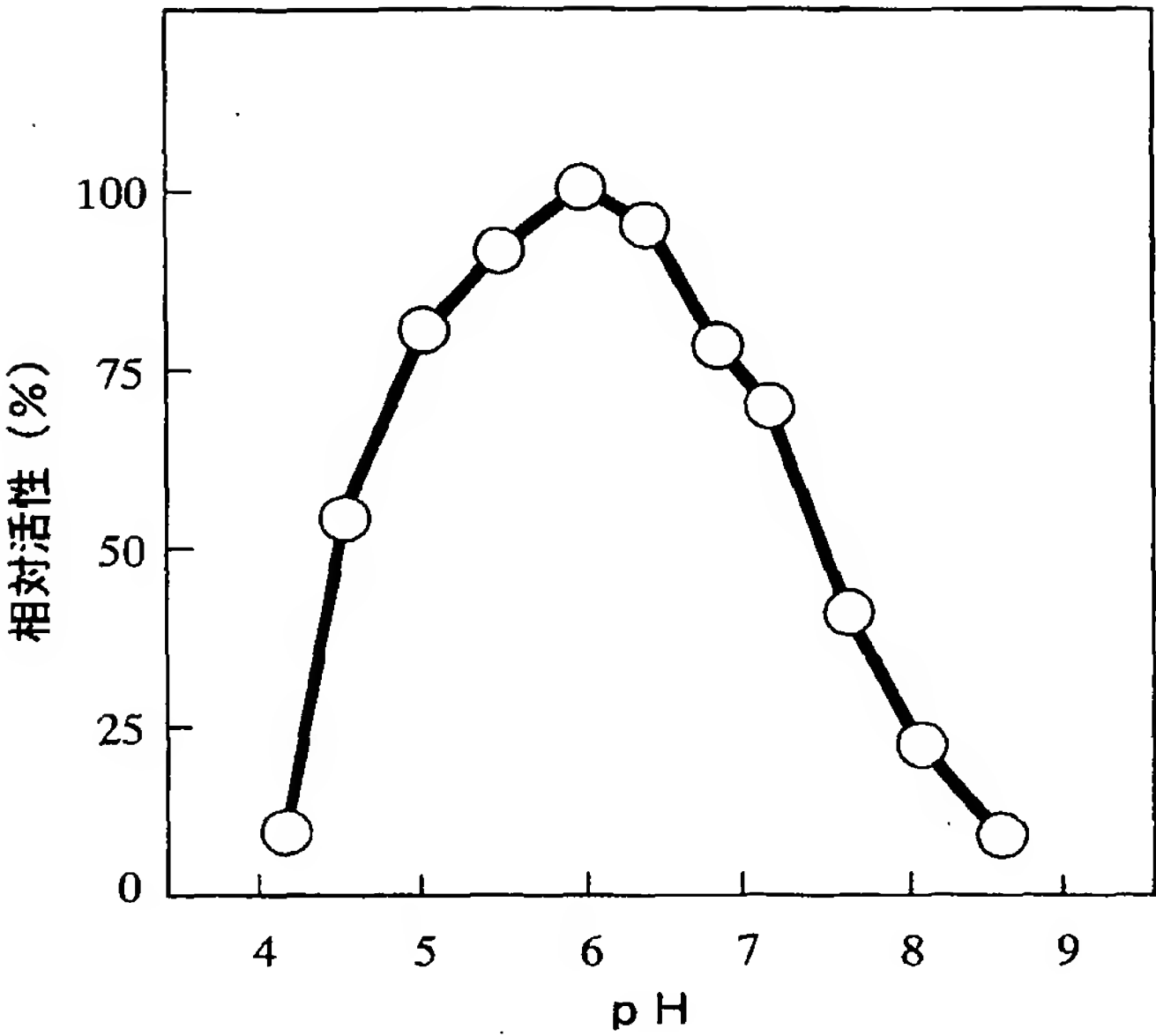
第 4 図



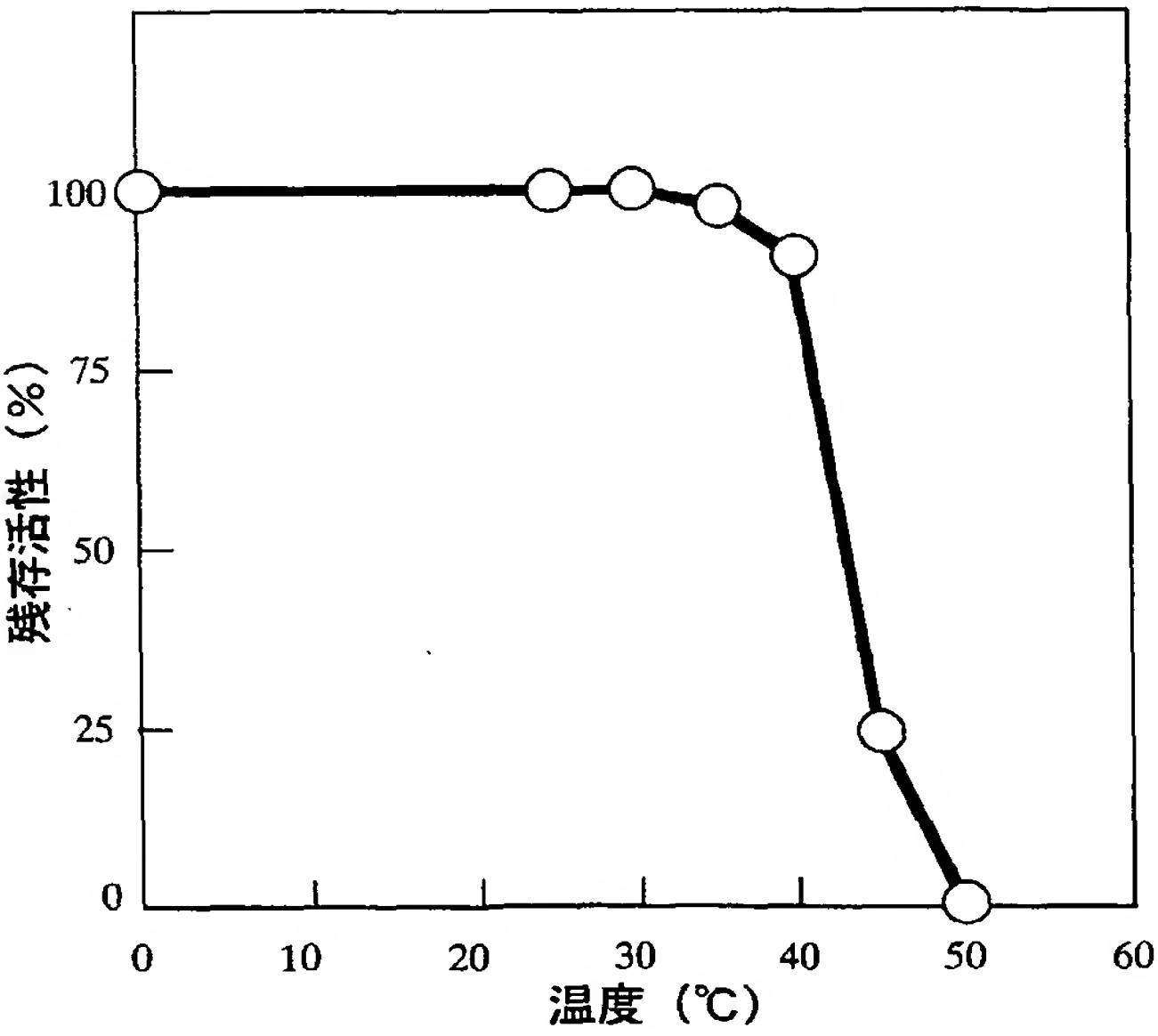
第 5 図



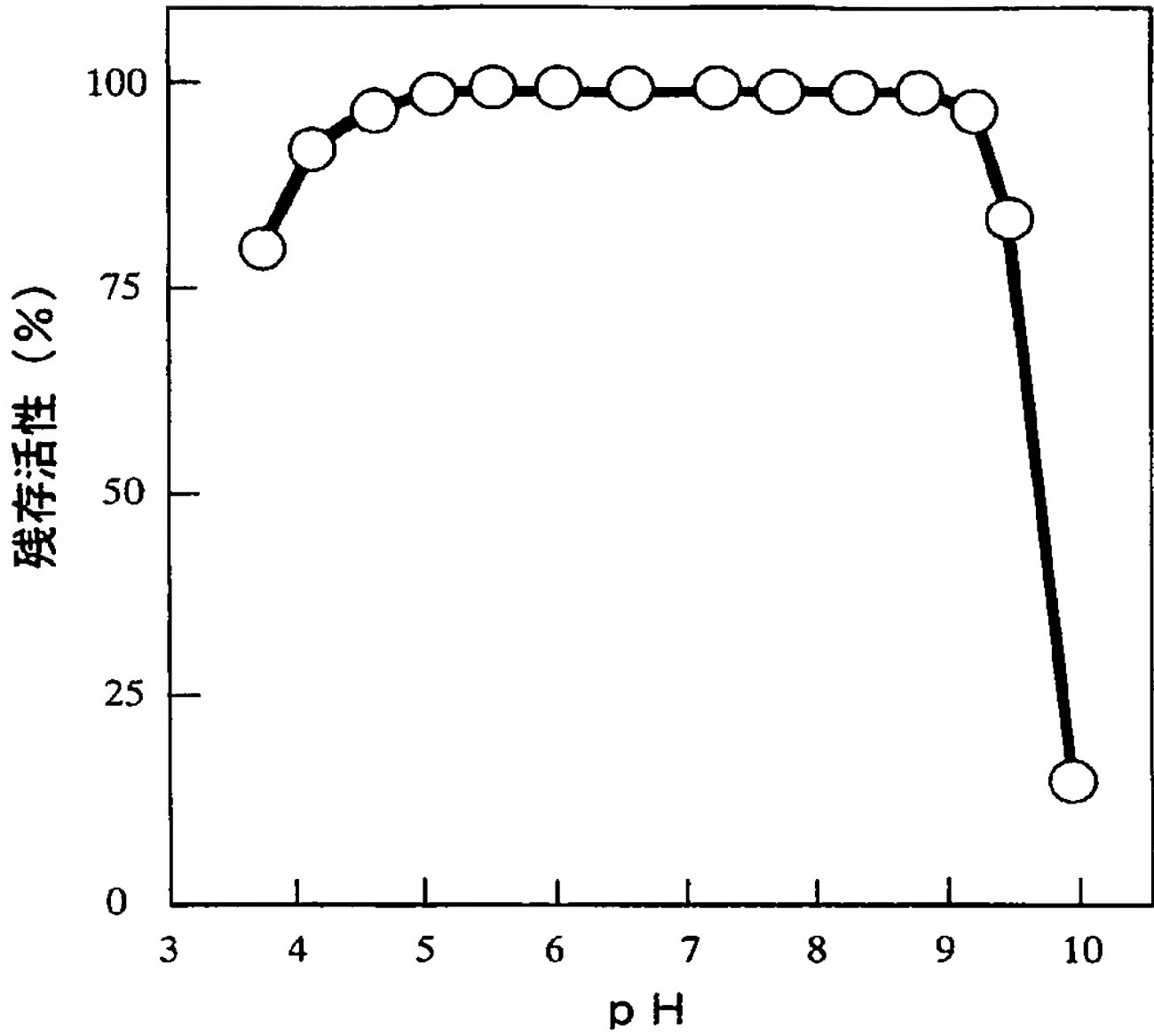
第 6 图



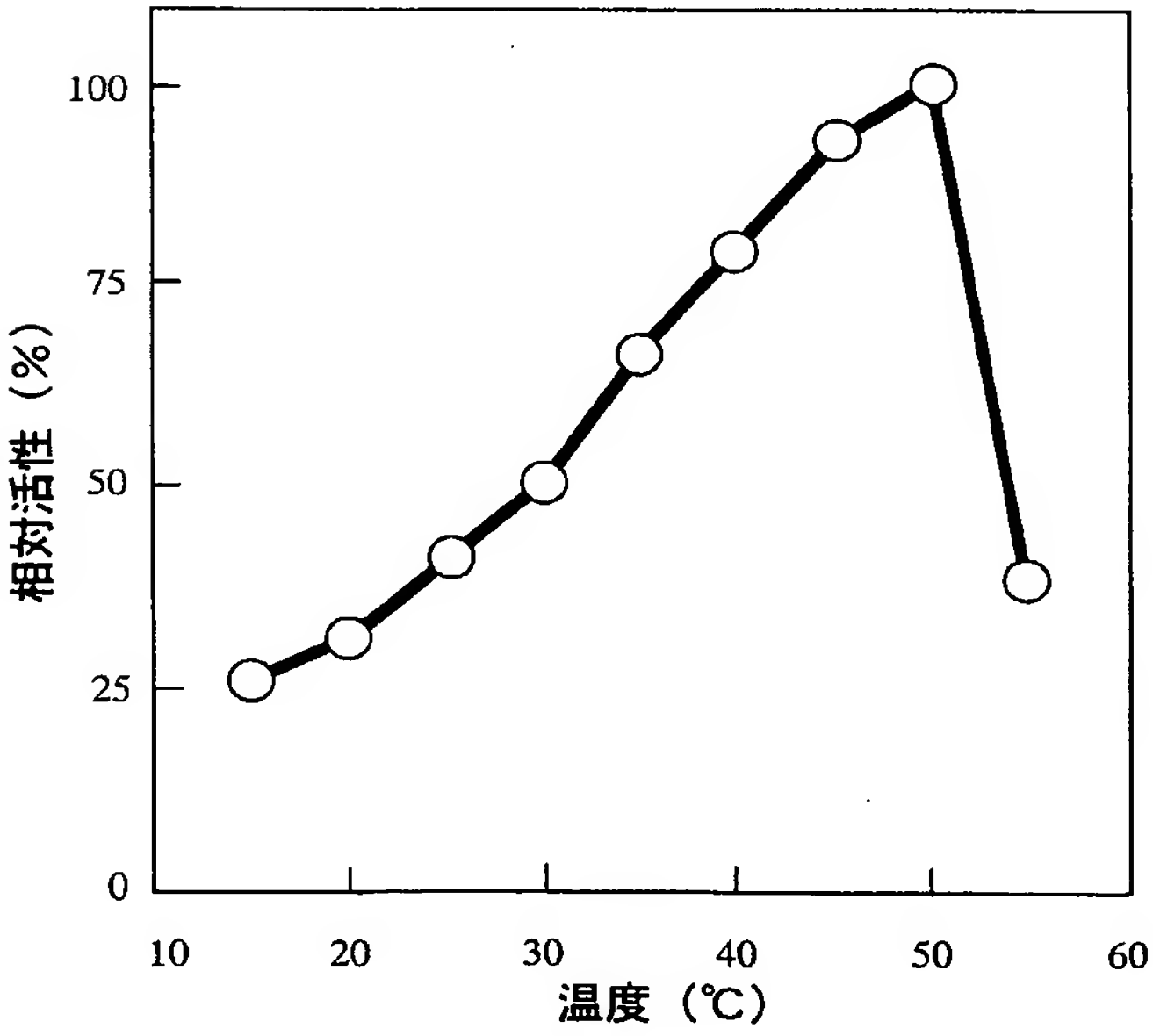
第 7 图



第 8 図

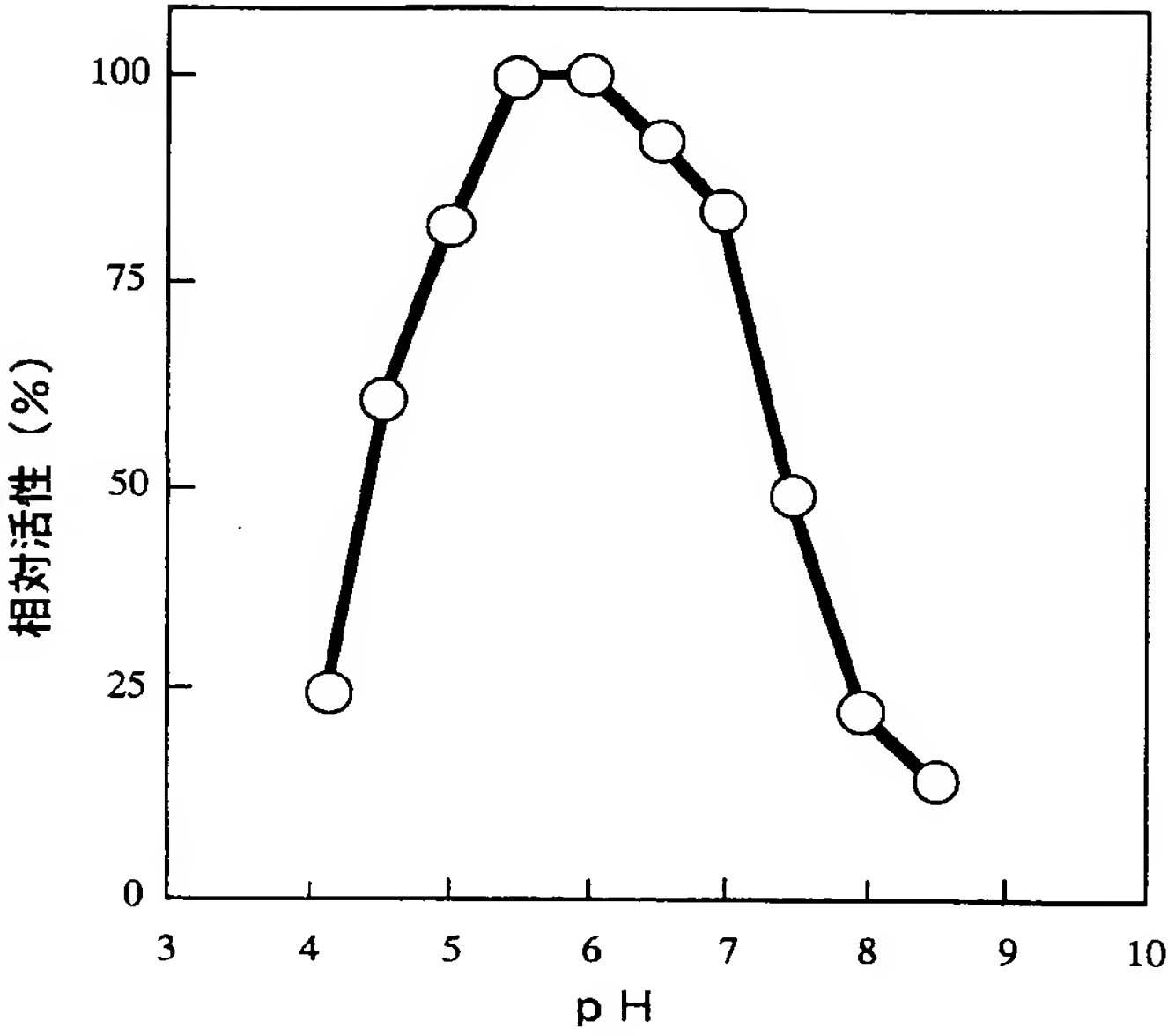


第 9 図

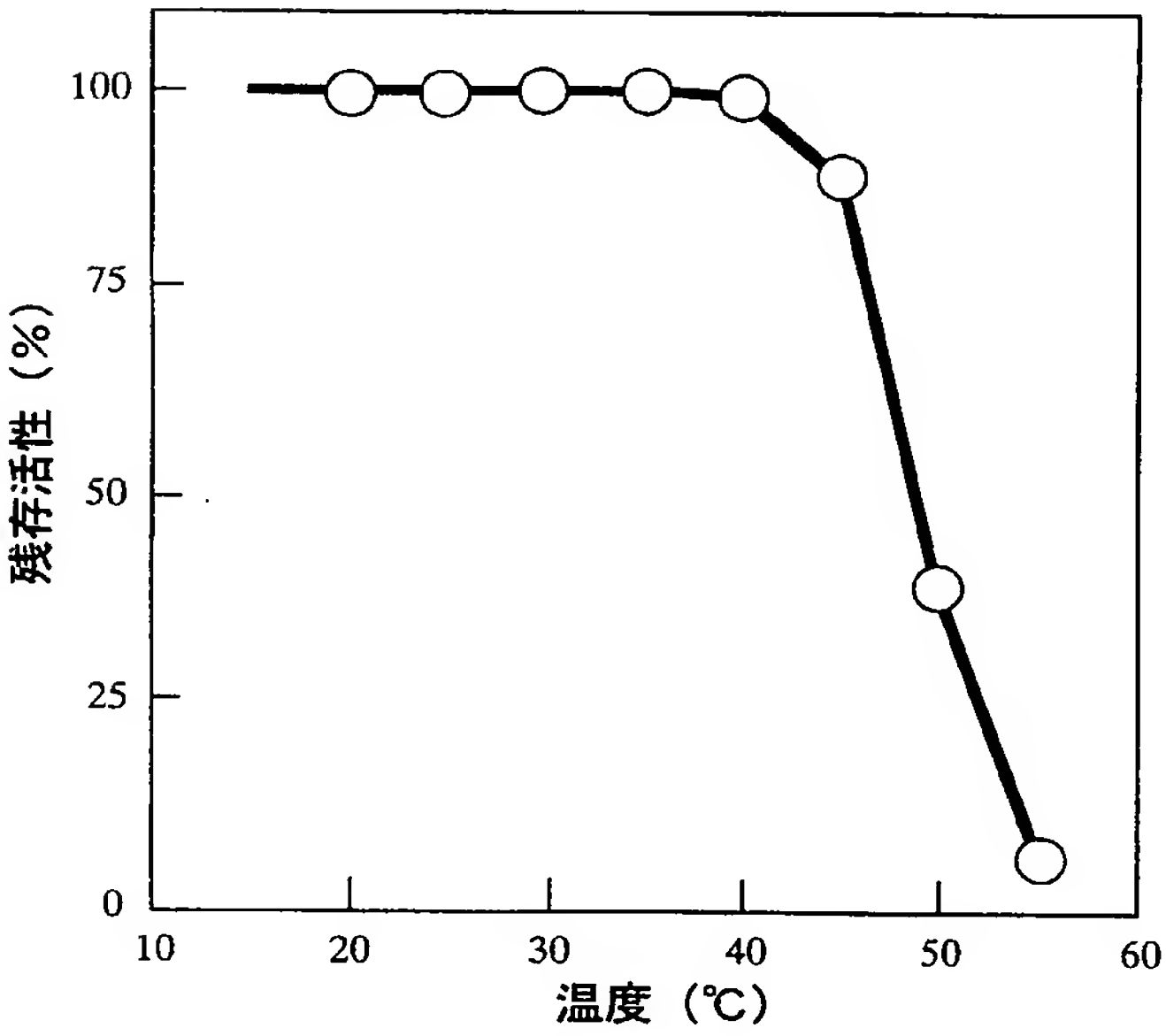




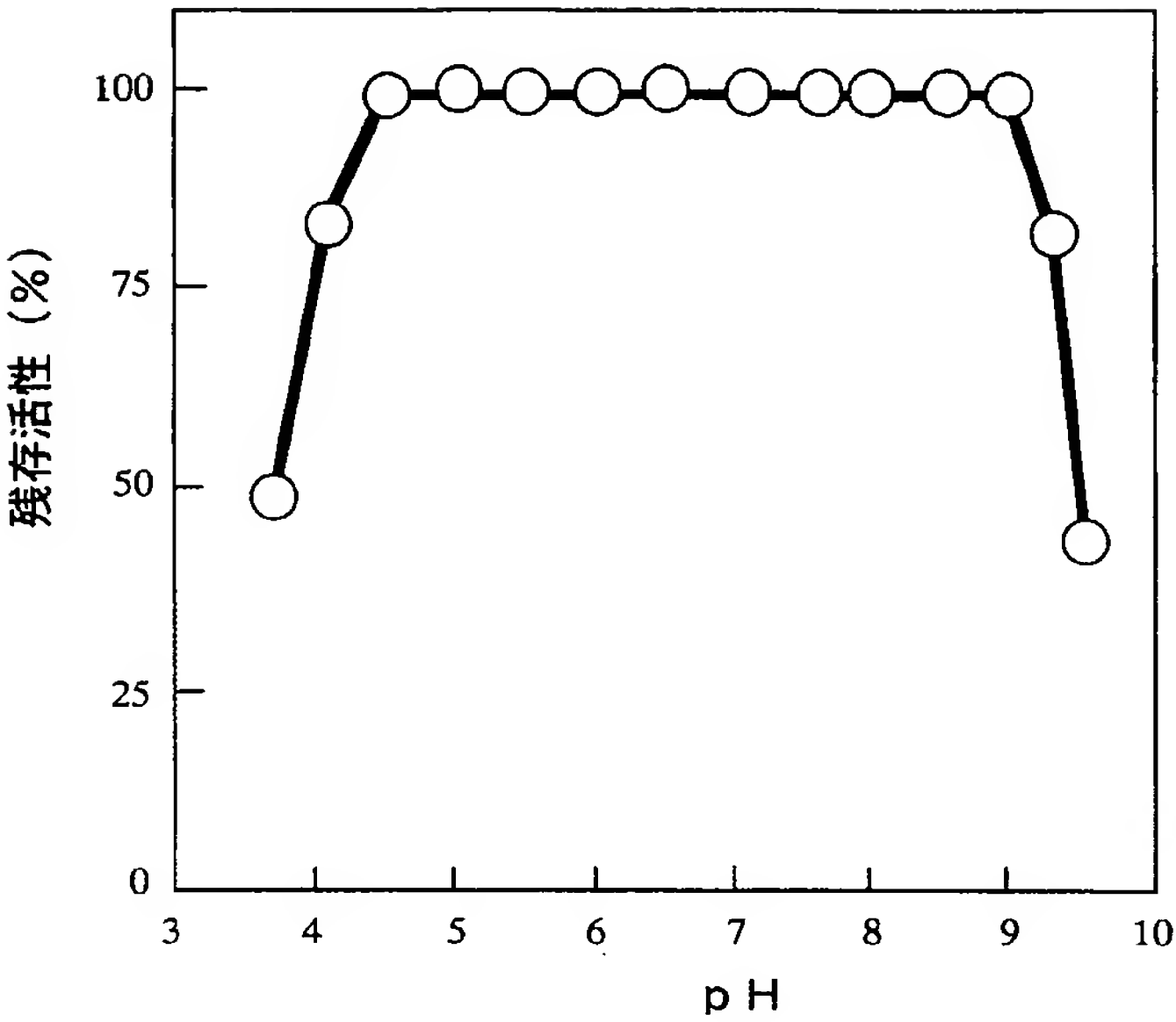
第 1 0 図



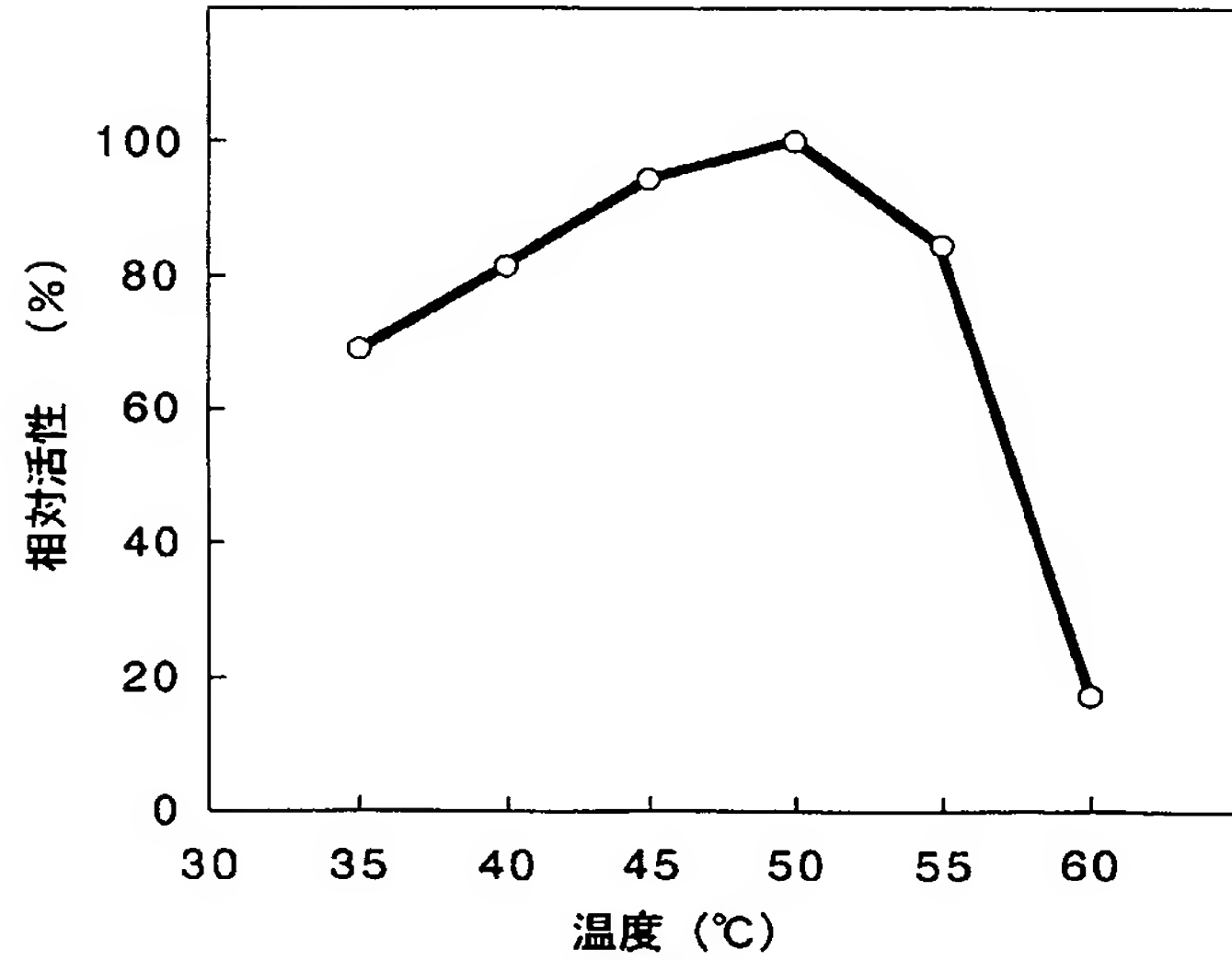
第 1 1 図



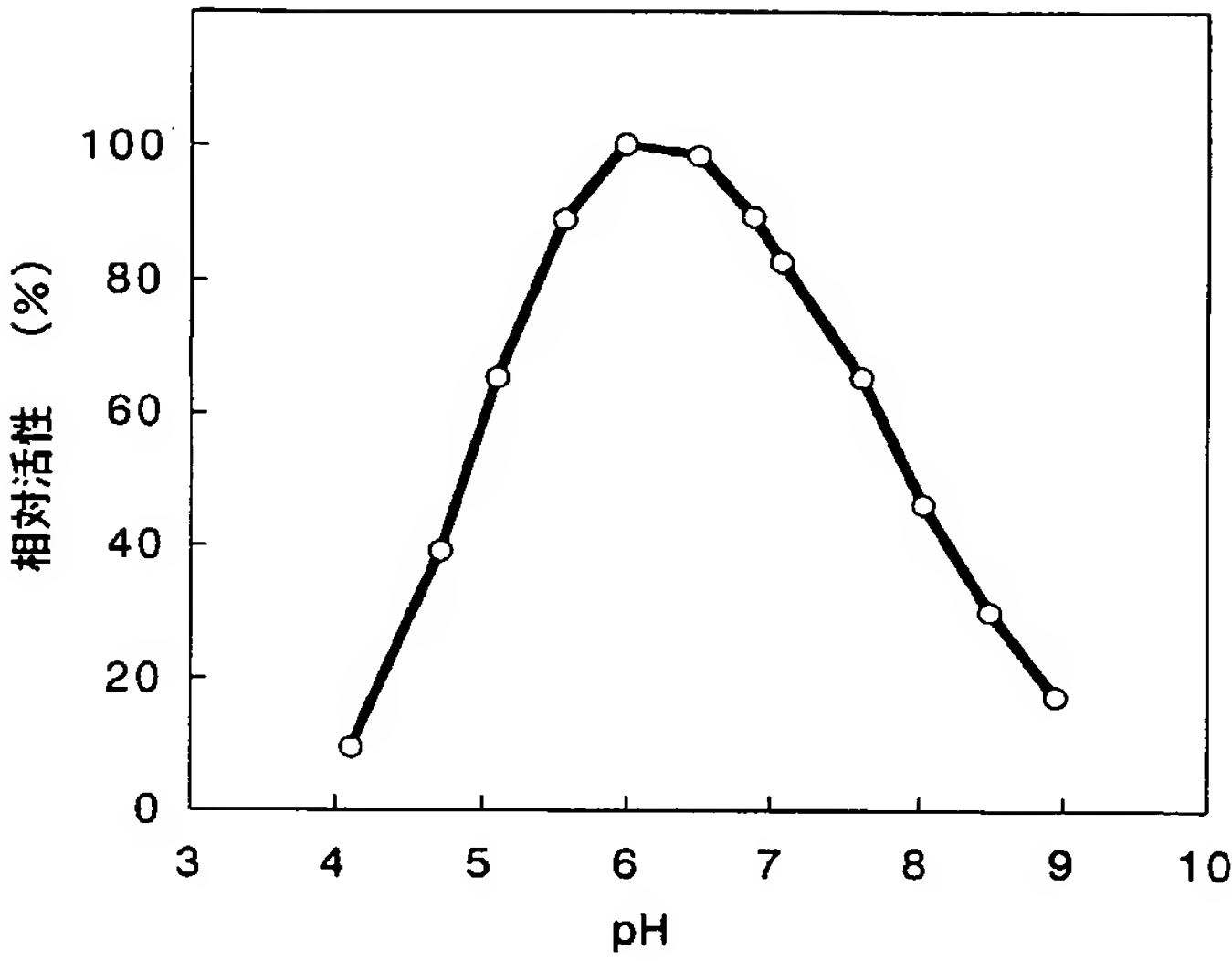
第 1 2 図



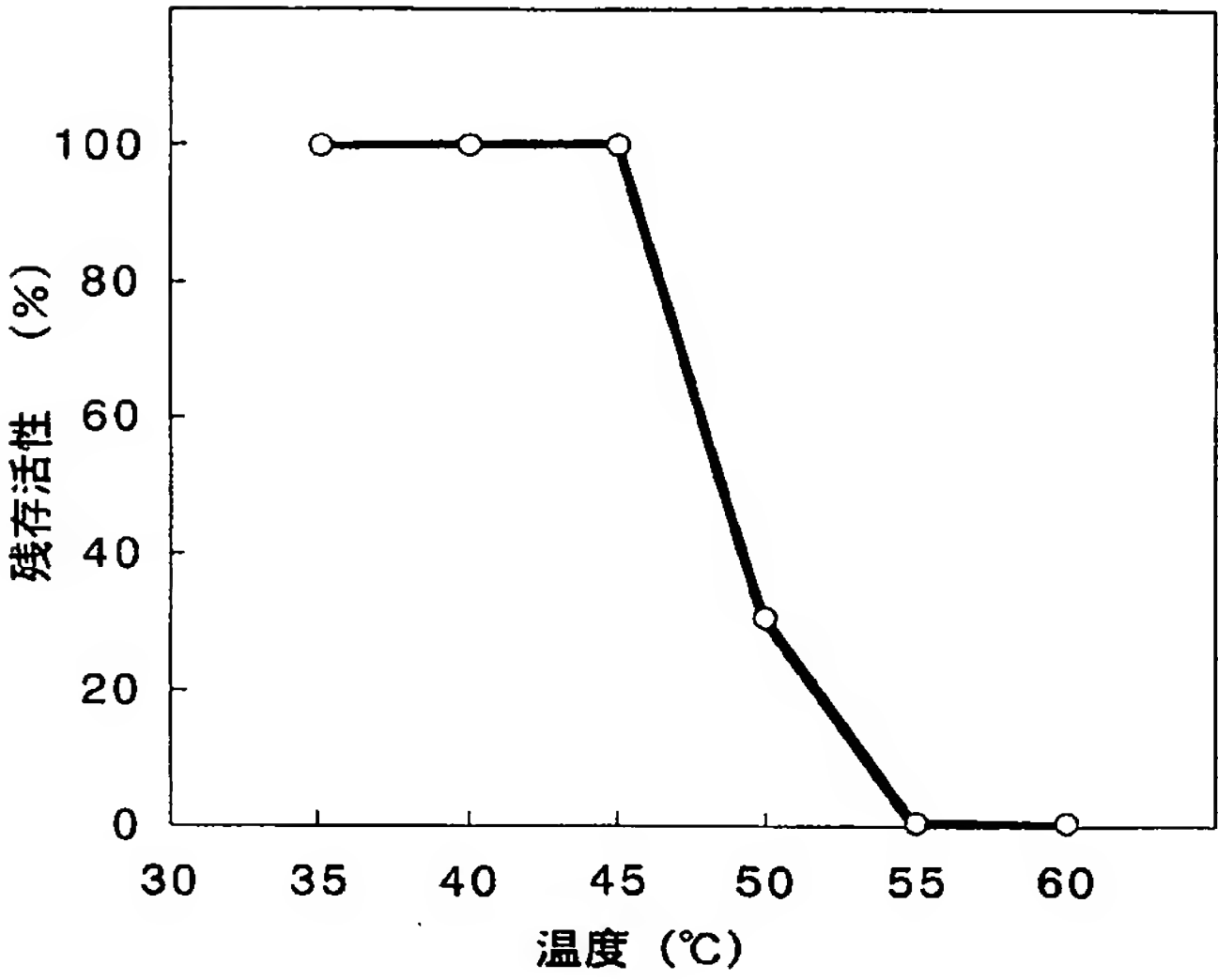
第 1 3 図



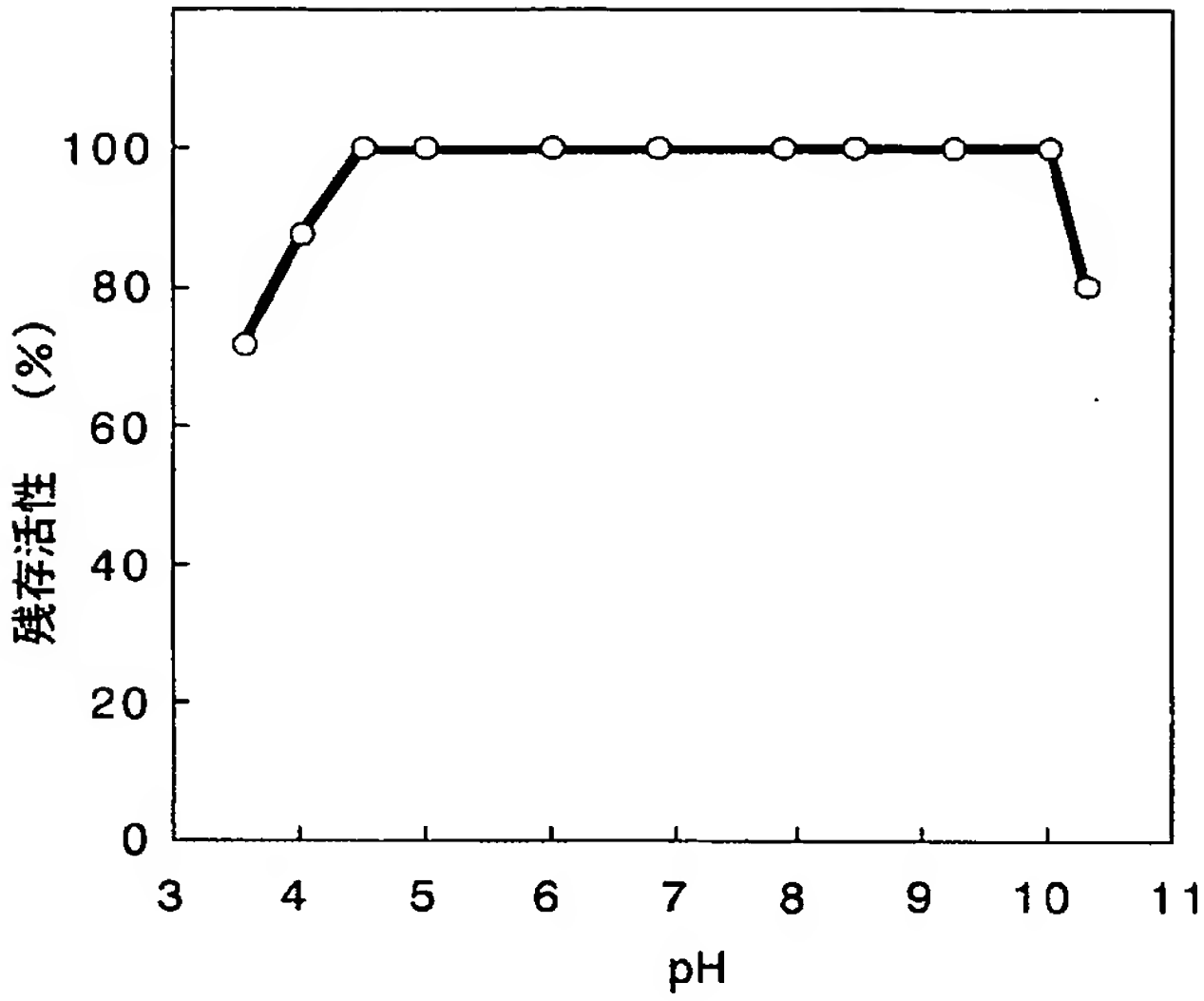
第 1 4 図



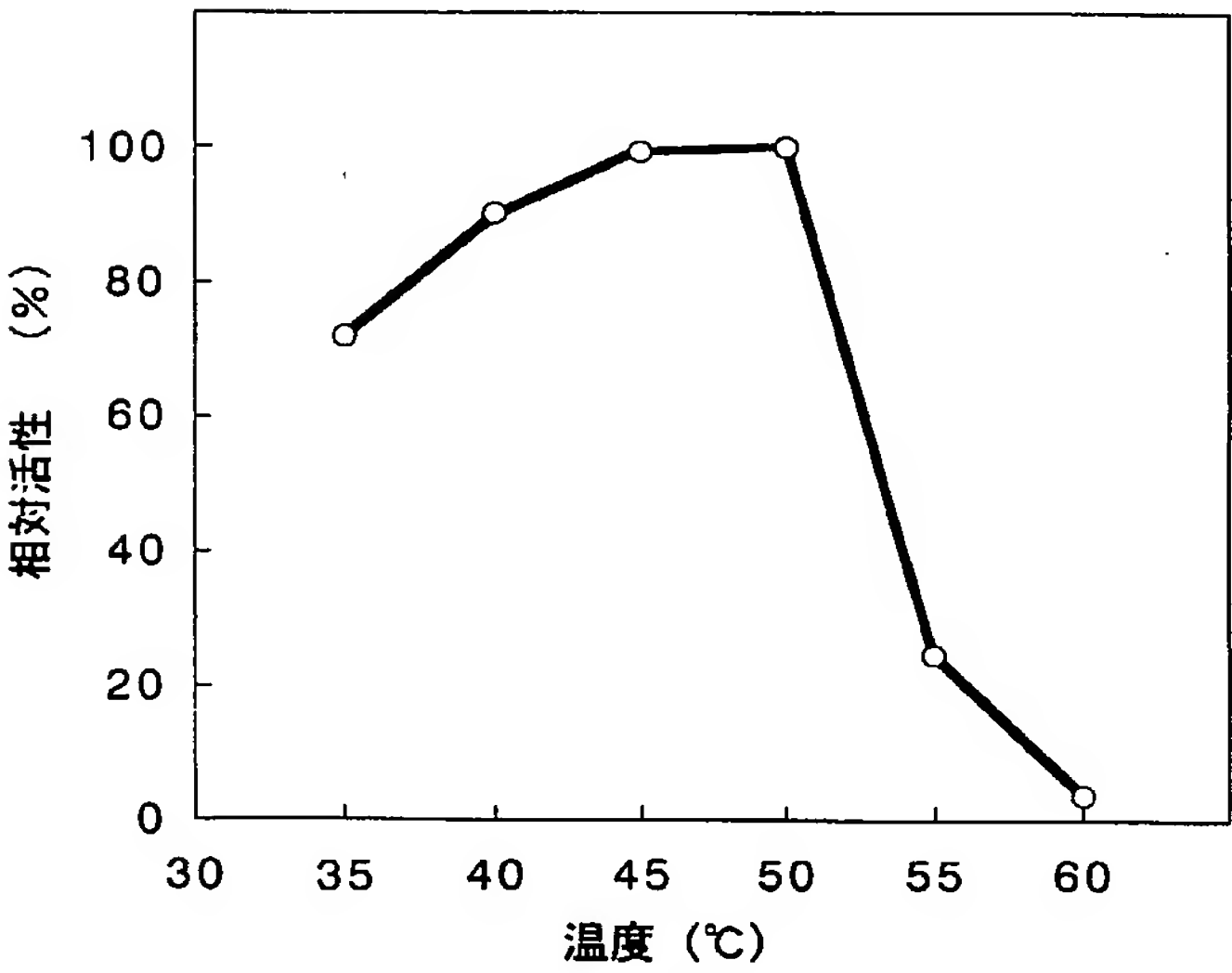
第 1 5 図



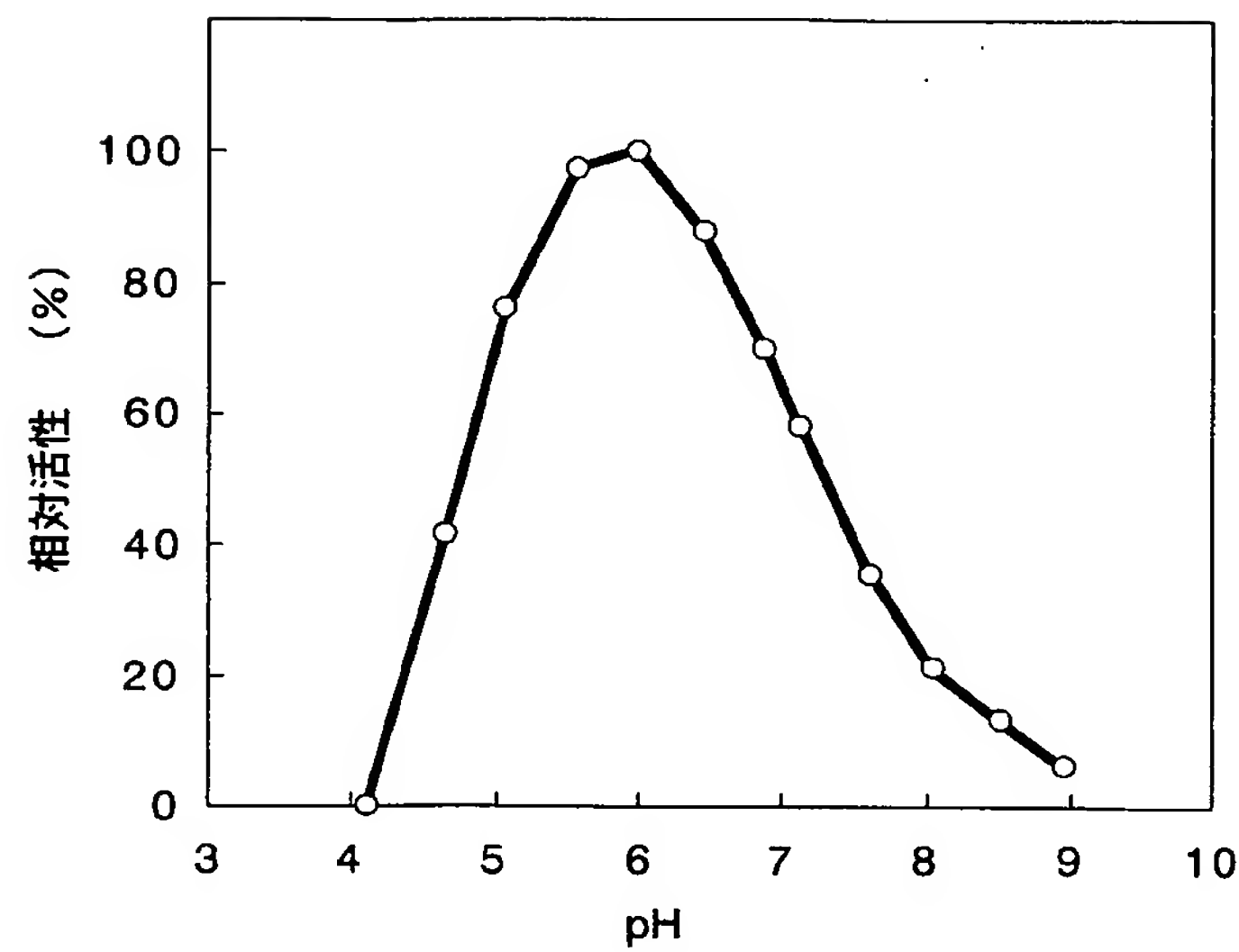
第 1 6 図



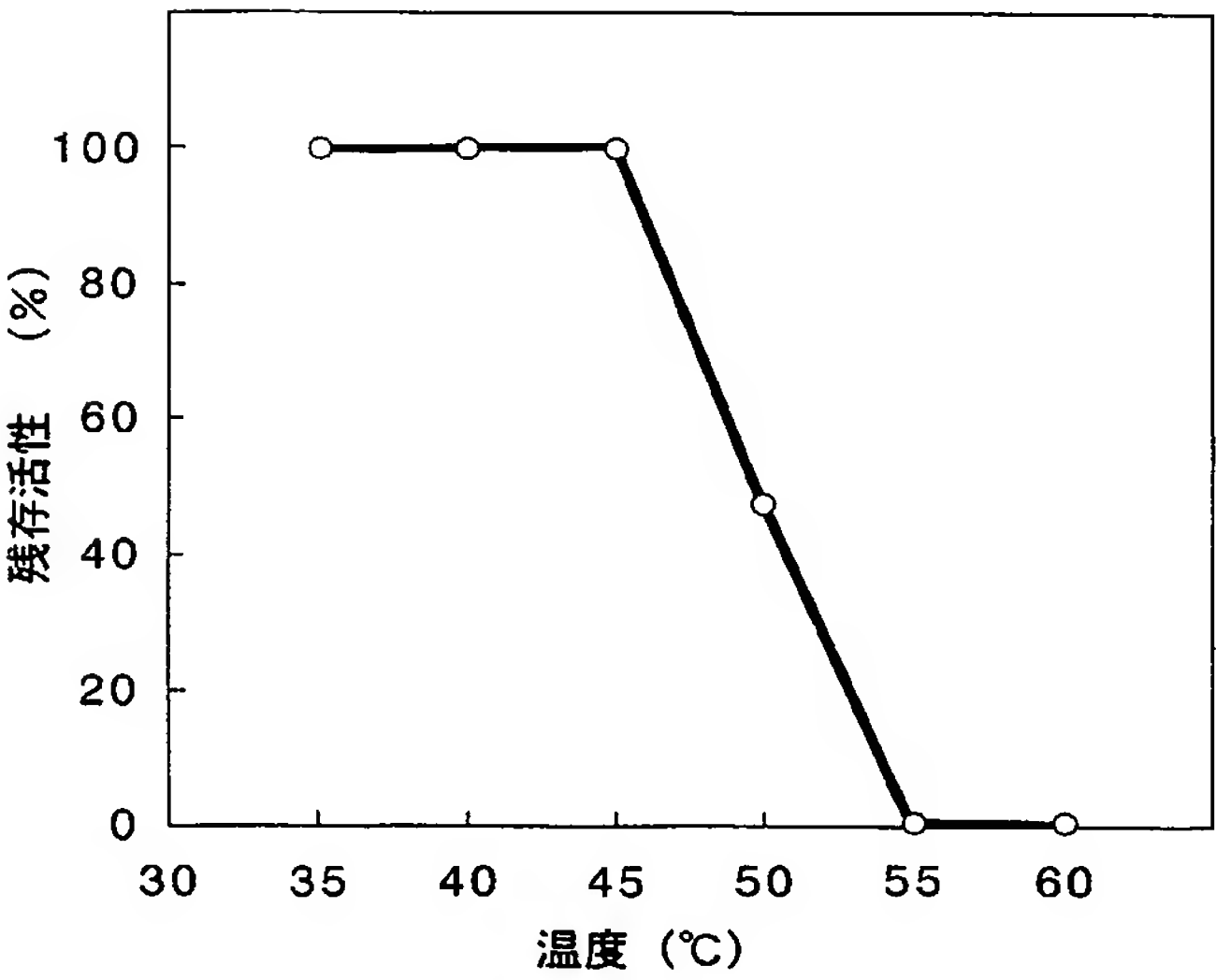
第 1 7 図



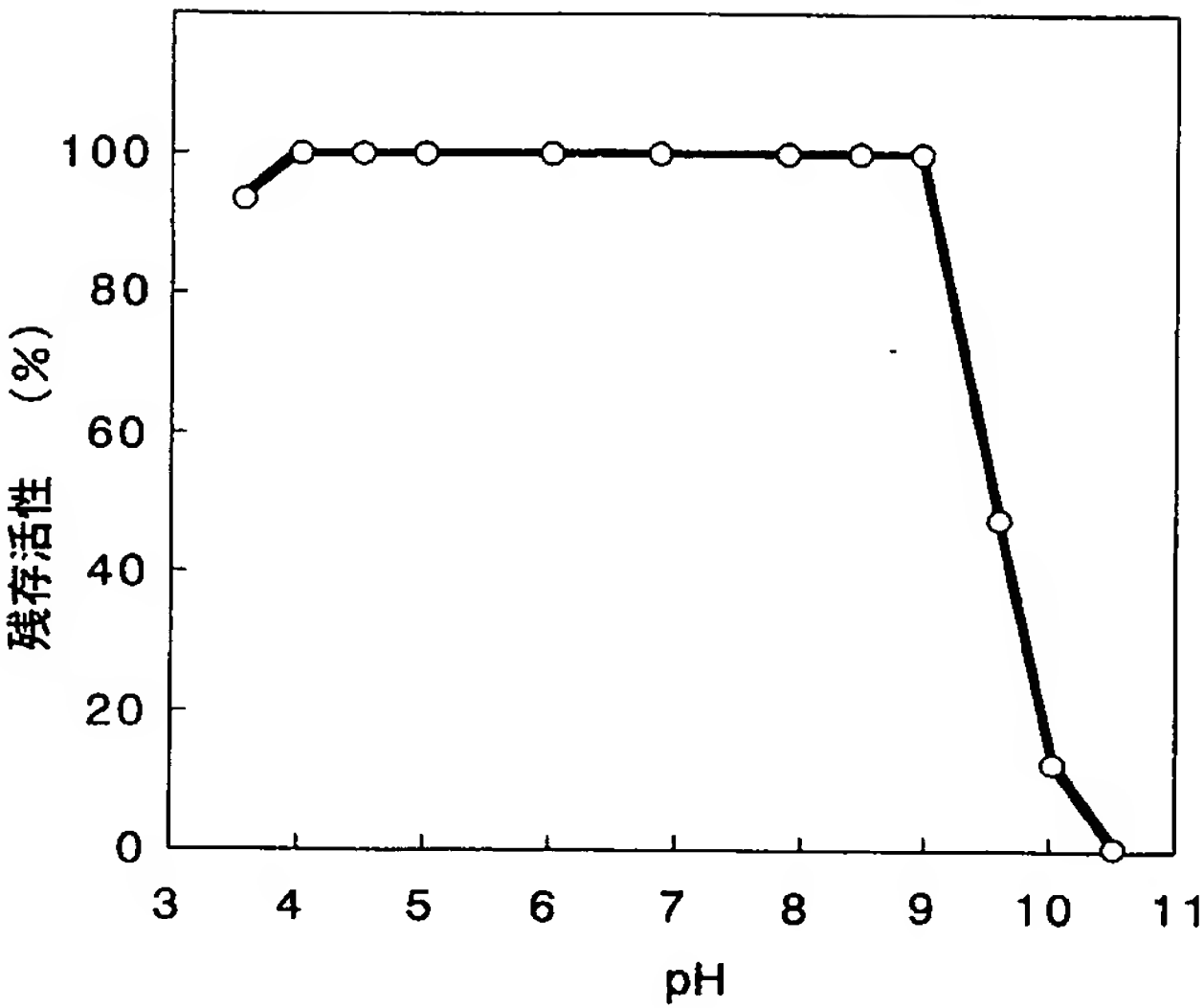
第 1 8 图



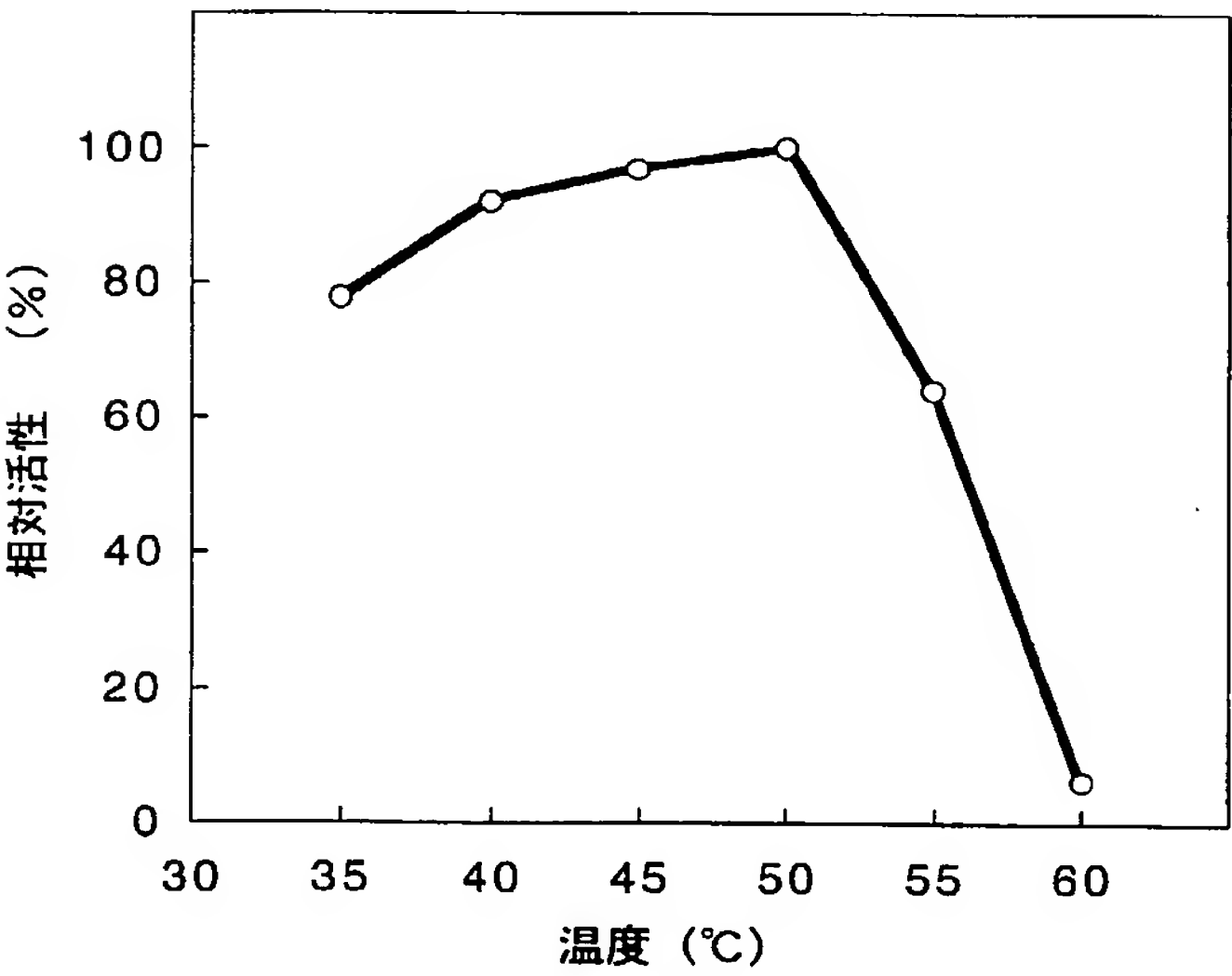
第 1 9 图



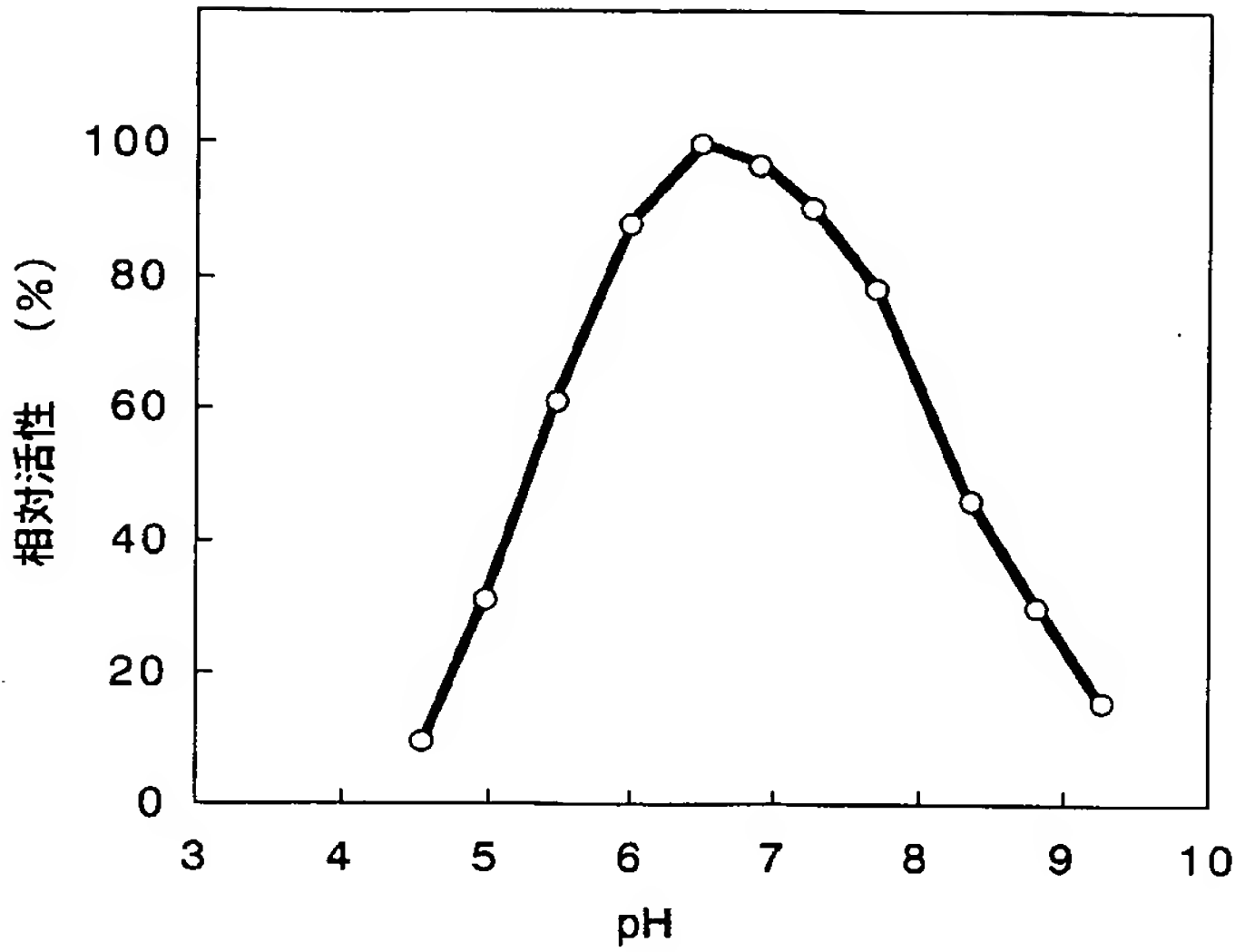
第 20 图



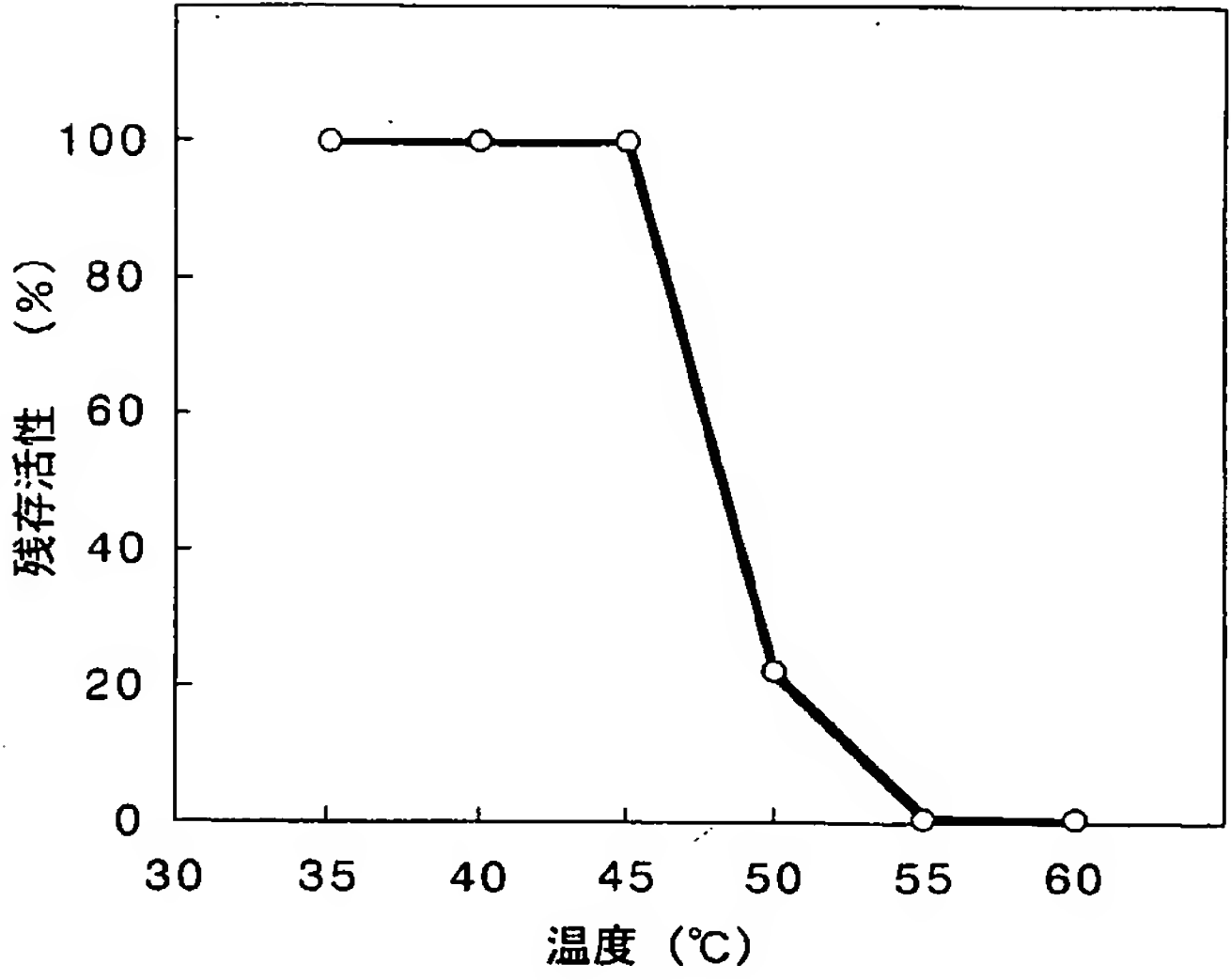
第 21 图



第 2 2 図

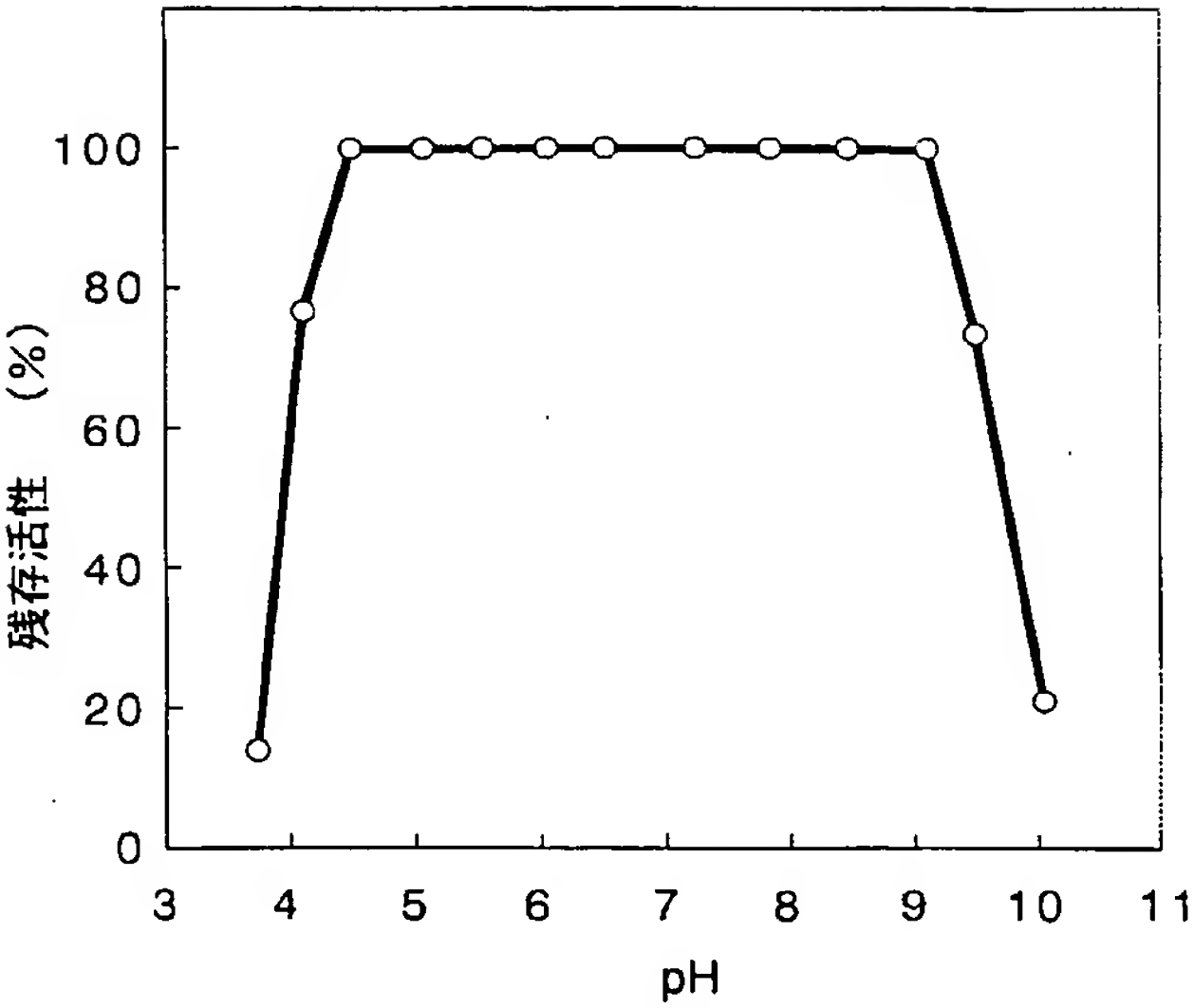


第 2 3 図

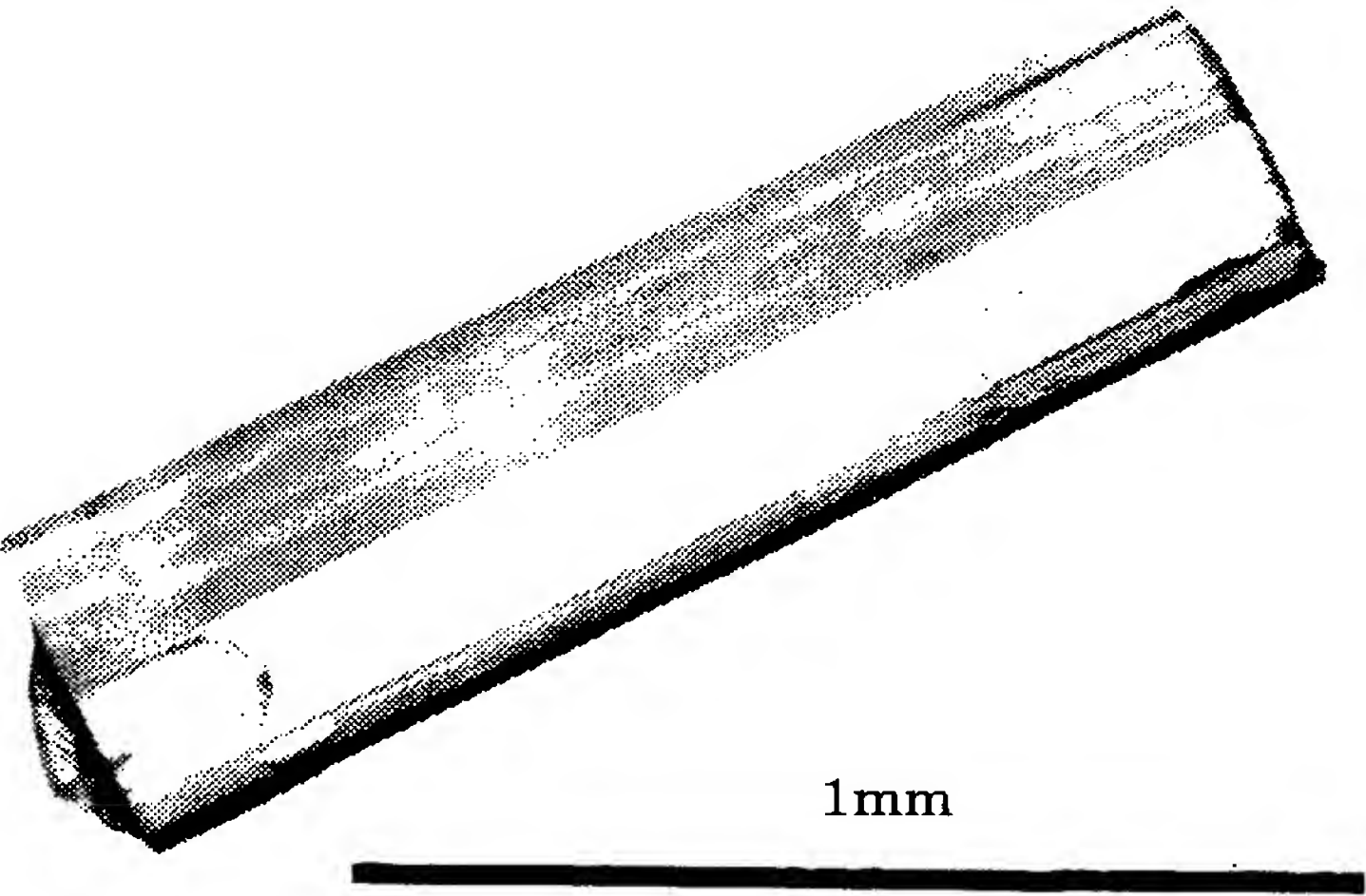




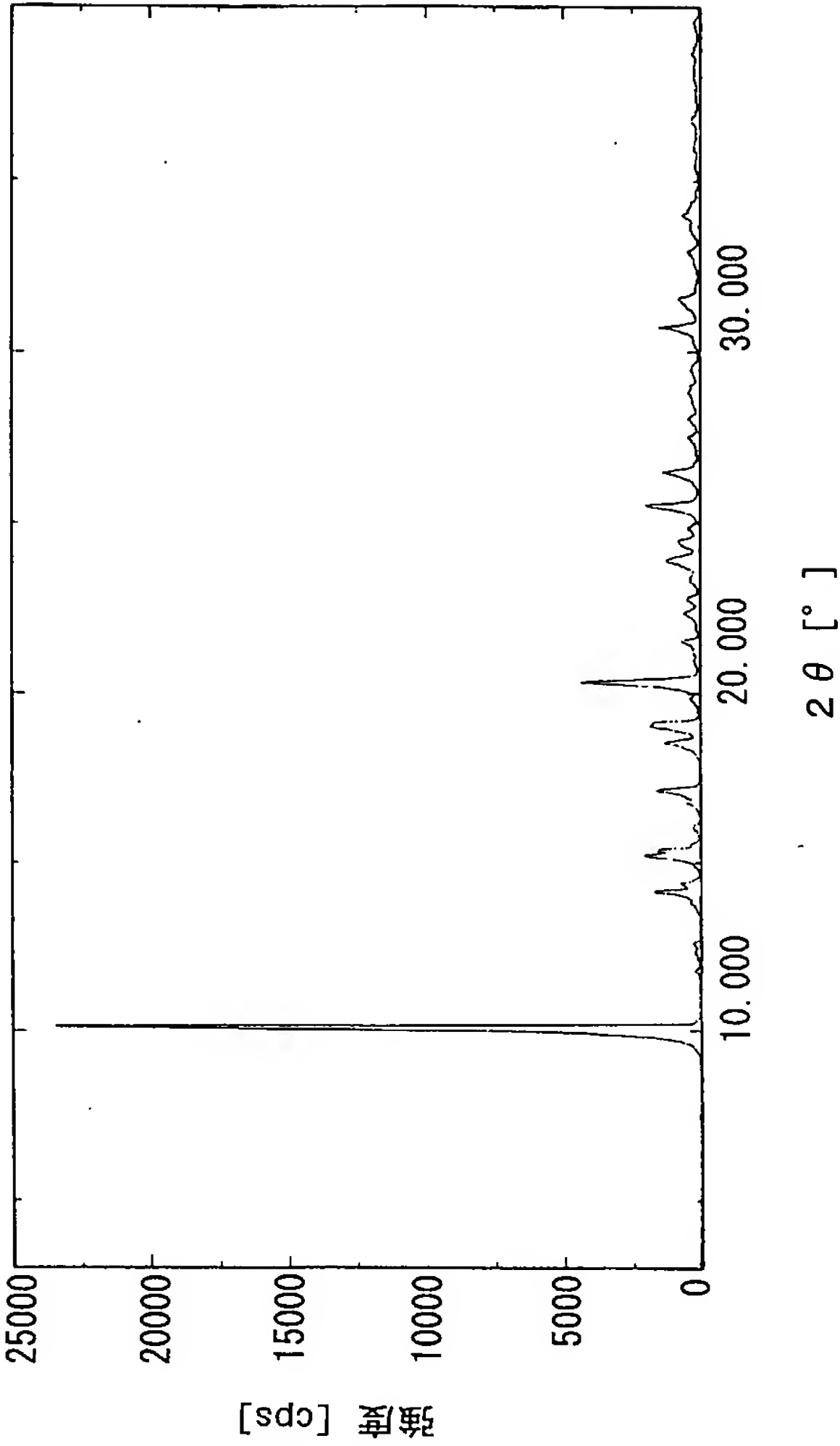
第 2 4 図



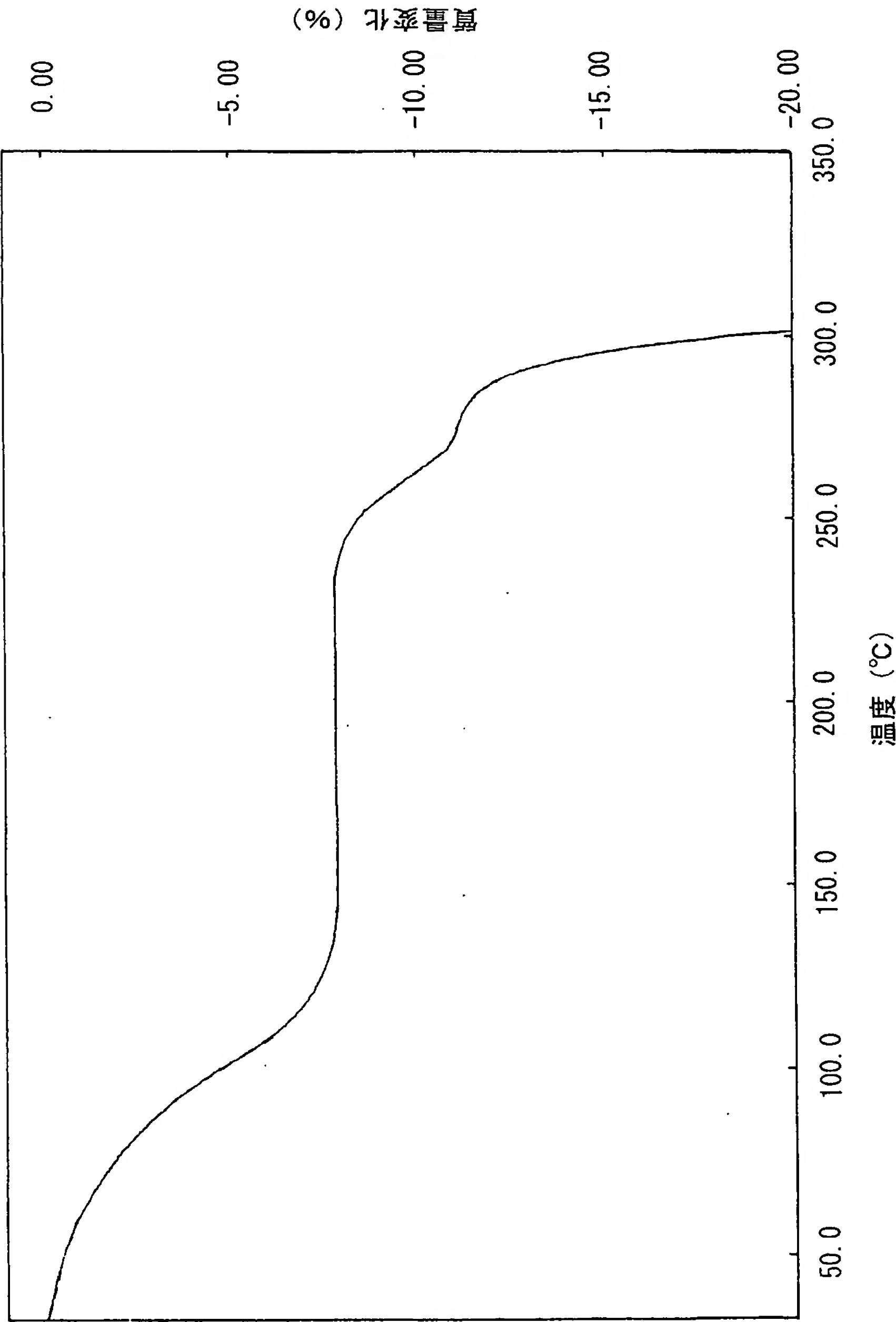
第 2 5 図



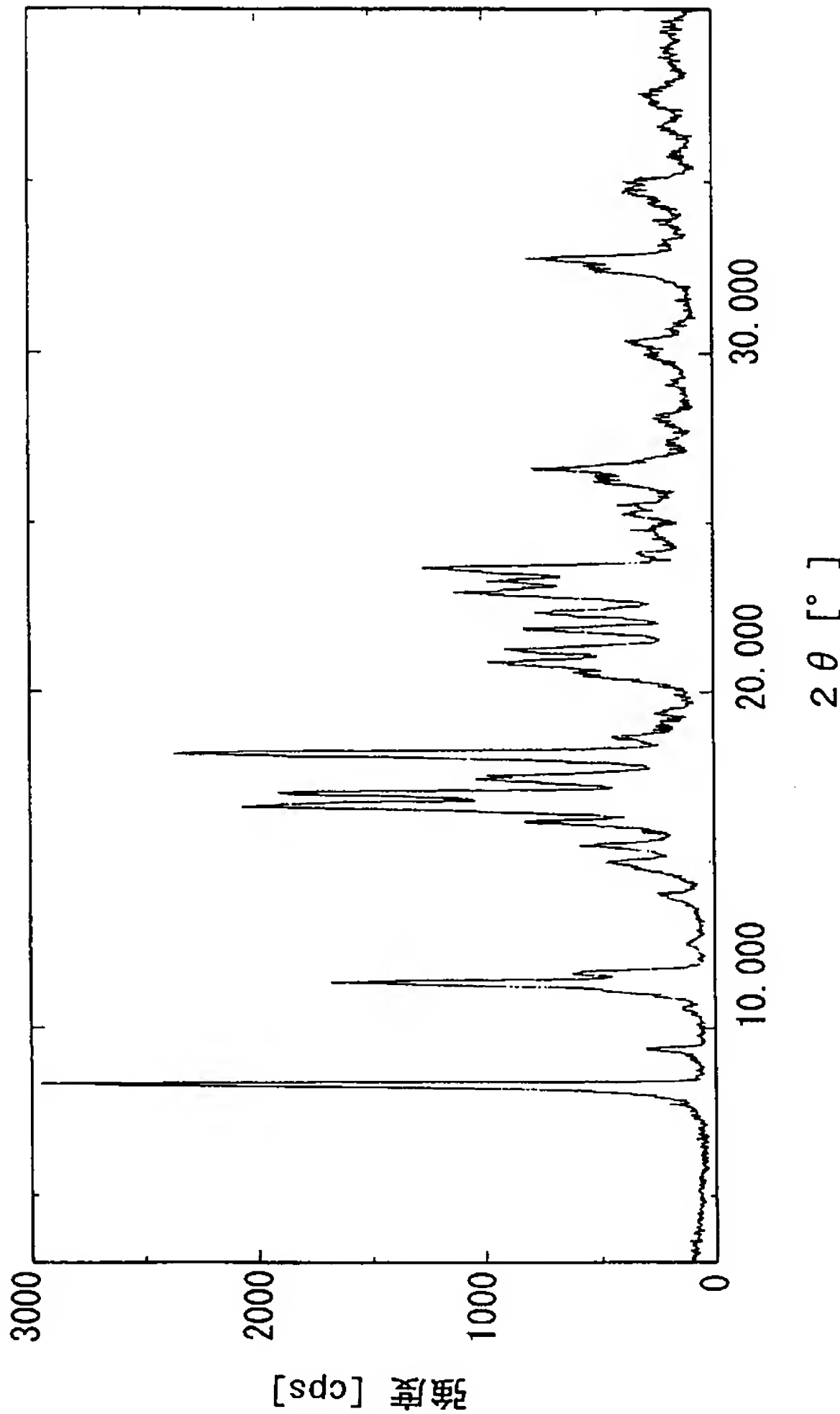
第 26 図



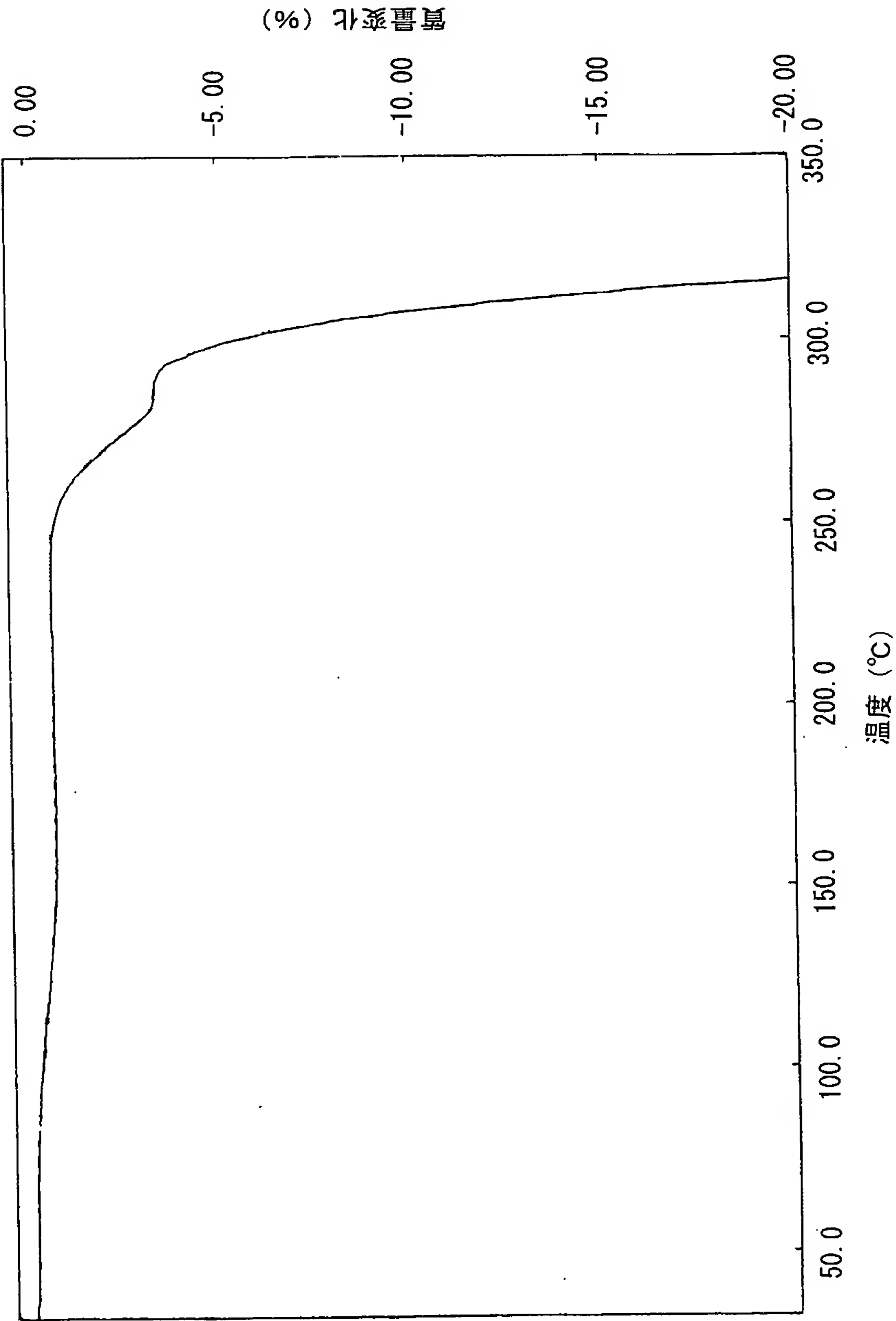
第 2 7 図



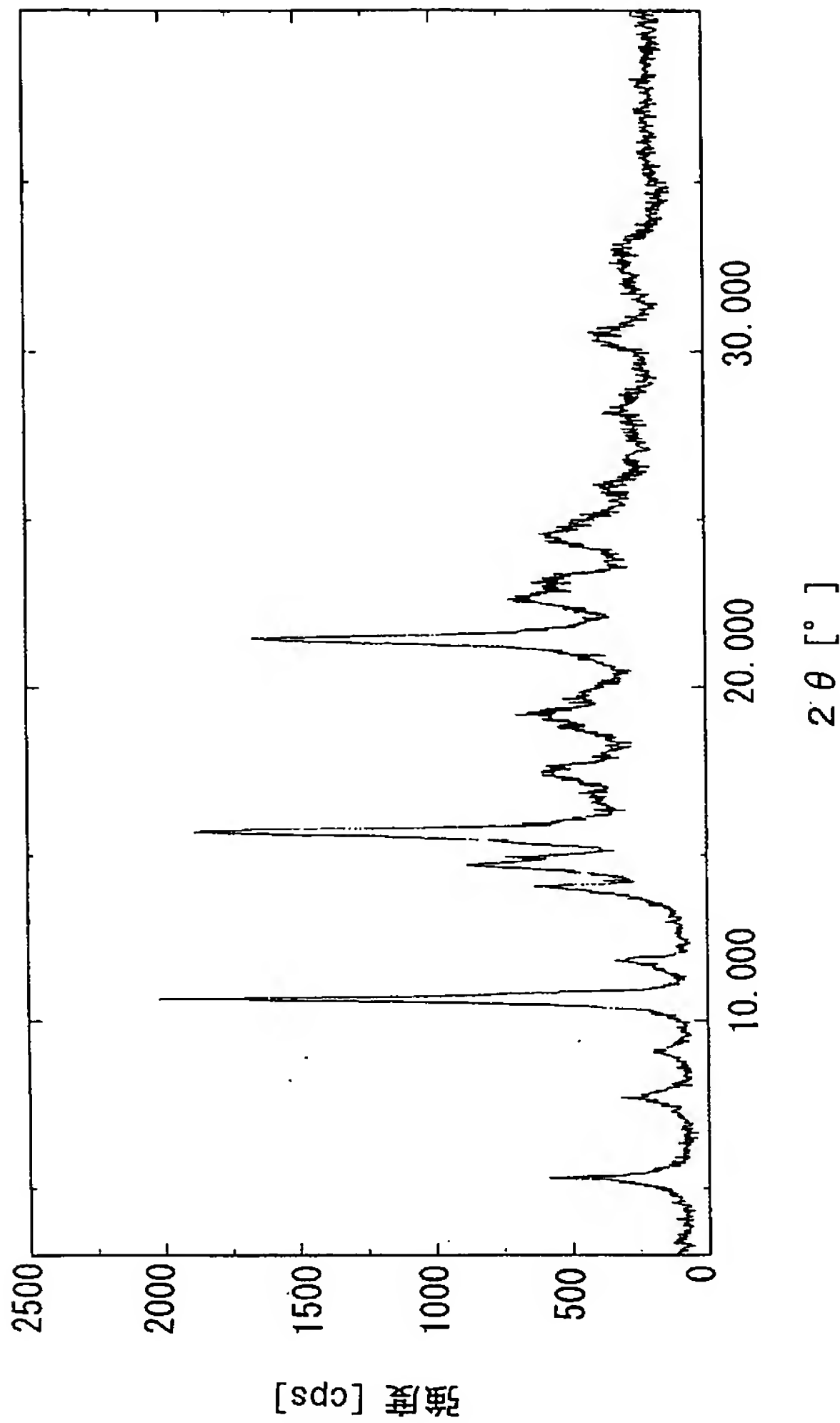
第 28 図



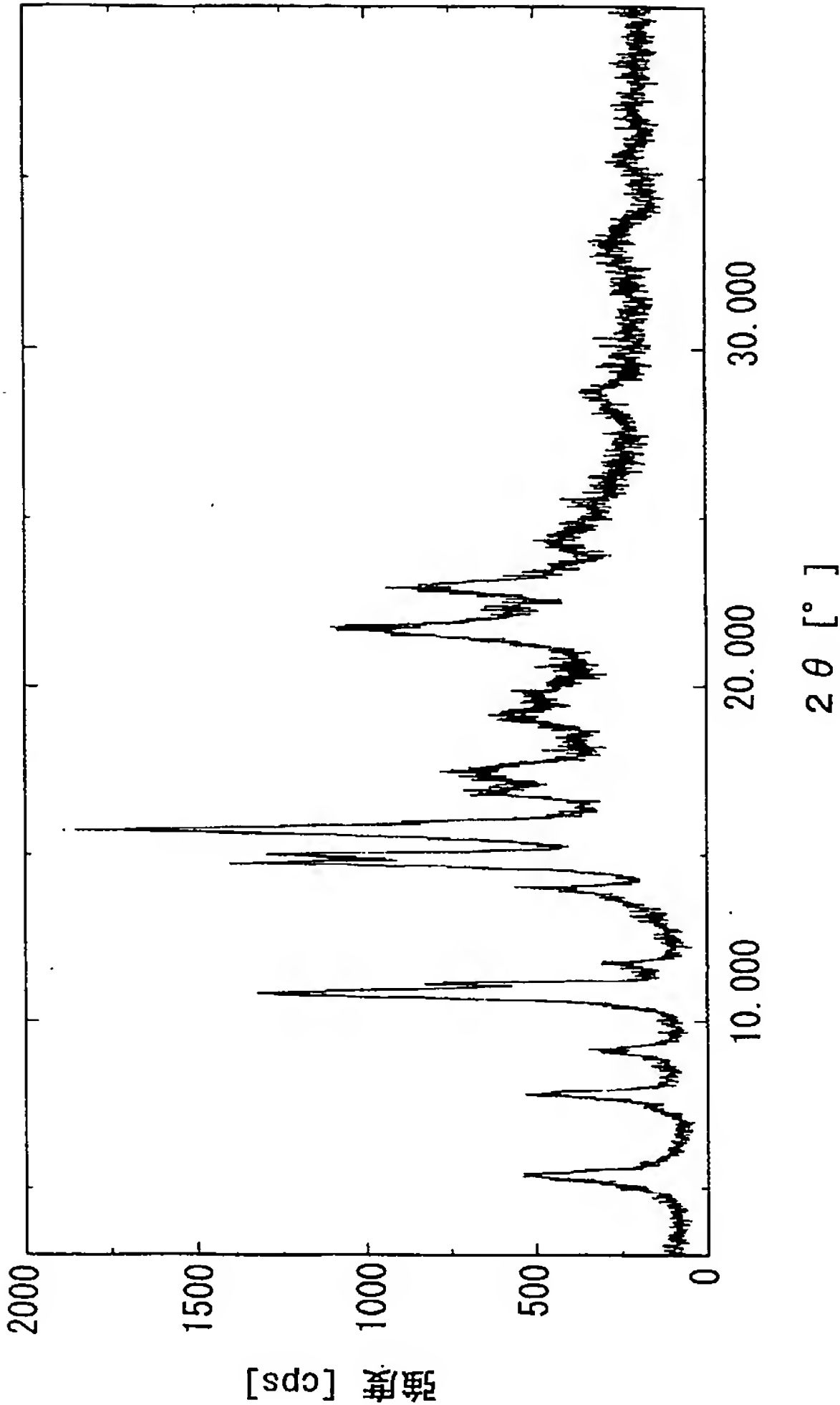
第 2 9 図



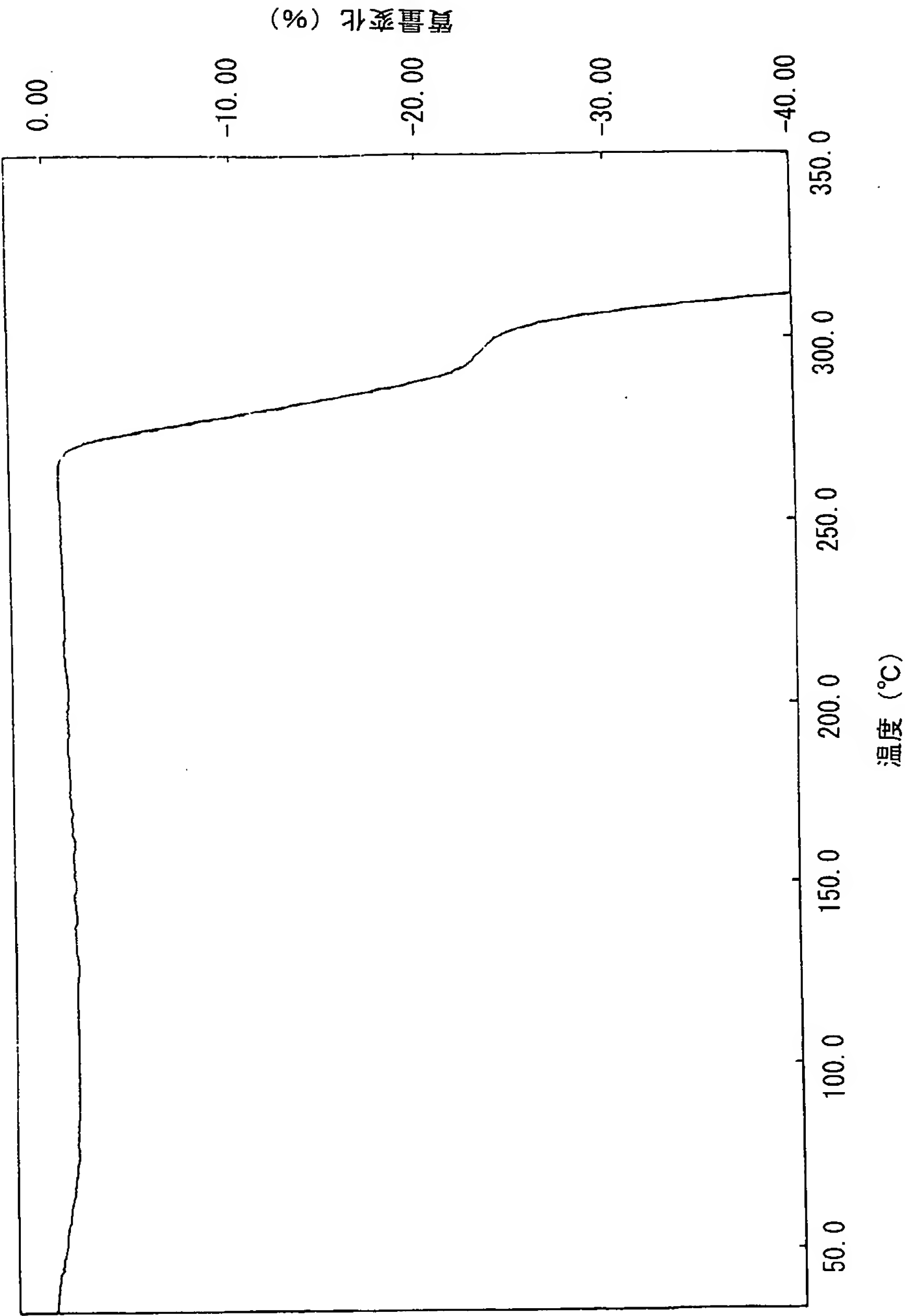
第 30 図



第 3 1 図



第 3 2 図





1.

## SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

<120>  $\alpha$ -Isomaltosyl-transferring enzyme, its preparation and uses

<130> W0843

<150> JP 149,484/00

<151> 2000-5-22

<150> JP 229,557/00

<151> 2000-7-28

<160> 10

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Bacillus globisporus

<400> 1

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro

1

5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Bacillus globisporus

<400> 2

Gly Asn Glu Met Arg Asn Gln Tyr

1

5

<210> 3

<211> 8

2.

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 3

Ile Thr Thr Trp Pro Ile Glu Ser

1

5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 4

Trp Ala Phe Gly Leu Trp Met Ser

1

5

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 5

Asn Trp Trp Met Ser Lys

1

5

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 6

Thr Asp Gly Gly Glu Met Val Trp

1

5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 8

3,

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 7

Asn Ile Tyr Leu Pro Gln Gly Asp

1

5

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arthrobacter ramosus

&lt;400&gt; 8

Asp Thr Leu Ser Gly Val Phe His Gly Pro

1

5

10

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 9

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro Asn Gly

1

5

10

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus globisporus

&lt;400&gt; 10

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro Tyr Gly

1

5

10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04276

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/24, C12N1/20, C12P19/18, C12N15/56, C07H3/06, A61K47/26, A61K7/50, A61K7/16, A61K7/48, C13K13/00, A23L1/09 // (C12N9/24, C12R1:06, C12R1:07)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/24, C12N1/20, C12P19/18, C12N15/56, C07H3/06, A61K47/26, A61K7/50, A61K7/16, A61K7/48, C13K13/00, A23L1/09, C12R1:06, C12R1:07

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)  
MEDLINE SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5889179 A (U.S. Secretary of Agriculture), 30 March, 1999 (30.03.99), (Family: none)	1-4, 6-8, 13-19, 27-42
T	COTE, G. L. et al., "The hydrolytic and transferase action of alternanase on oligosaccharides", Carbohydr. Res., (2001), Vol.332, pages 373 to 379 (page 374, right column, lines 35 to 39)	1-42
A	COTE, G. L. et al., "Enzymically produced cyclic alpha-1,3-linked and alpha-1,6-linked oligosaccharides of D-glucose", Eur. J. Biochem., (1994), Vol.226, pages 641 to 648	1-42

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing  
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means

"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
08 August, 2001 (08.08.01)

Date of mailing of the international search report  
21 August, 2001 (21.08.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl<sup>7</sup> C12N9/24, C12N1/20, C12P19/18, C12N15/56, C07H3/06, A61K47/26, A61K7/50, A61K7/16, A61K7/48, C13K13/00, A23L1/09 // (C12N9/24, C12R1:06, C12R1:07)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl<sup>7</sup> C12N9/24, C12N1/20, C12P19/18, C12N15/56, C07H3/06, A61K47/26, A61K7/50, A61K7/16, A61K7/48, C13K13/00, A23L1/09, C12R1:06, C12R1:07

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN) REGISTRY (STN)

MEDLINE SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	US 5889179 A (US SEC. OF AGRIC.) 30.3月.1999(30.03.99) (ファミリーなし)	1-4, 6-8, 13-19, 27-42
T	COTE, G. L. et al. The hydrolytic and transferase action of alternanase on oligosaccharides. Carbohydr. Res. 2001, Vol. 332, pages 373-379. (第374頁右欄第35~39行目参照)	1-42
A	COTE, G. L. et al. Enzymically produced cyclic alpha-1,3-linked and alpha-1,6-linked oligosaccharides of D-glucose. Eur. J. Biochem. 1994, Vol. 226, pages 641-648.	1-42

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.08.01

国際調査報告の発送日

21.08.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇



4B

3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3448